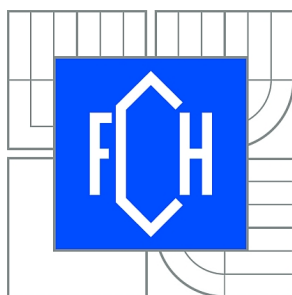




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV ZPŮSOBU PŘÍPRAVY SYSTÉMU BIOPOLYMER-TENZID NA AGREGAČNÍ VLASTNOSTI SYSTÉMU

INFLUENCE OF THE PREPARING OF A BIOPOLYMER-SURFACTANT SYSTEM
ON ITS AGGREGATION BEHAVIOR.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TEREZA KRUTIŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0436/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Tereza Krutišová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Krouská Ing. Tereza Halasová	

Název bakalářské práce:

Vliv způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid
na agregační vlastnosti systému

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o způsobech přípravy a následného studia vodných roztoků systémů biopolymer-tenzid, s přihlédnutím k hyaluronanu jako modelovému biopolymeru.
2. Seznámit se s možnými způsoby přípravy vodných roztoků výše uvedeného systému.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k porovnání různých způsobů přípravy vodných roztoků hyaluronan-tenzid.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi hyaluronanu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Tereza Krutišová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pro studium vlivu způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid na jeho agregační vlastnosti bylo navrženo několik experimentů. Bylo provedeno bližší zkoumání systému nativní hyaluronan-cetyltrimethylammonium bromid (CTAB). Systém byl zkoumán ve fosfátovém pufru (jen CTAB), ve vodě a ve fyziologickém roztoku (0,15M NaCl). Byl zkoumán vliv pořadí látek při míchání vzorků, vliv různých způsobů přípravy určitých koncentrací roztoků nebo vliv rozpouštění práškového biopolymeru tenzidem a naopak na výsledný systém. U všech připravených vzorků byla měřena intenzita fluorescence a byly zkoumány její změny. Jako fluorescenční sondy byly použity pyren a nilská červeň. U některých vzorků bylo měřeno také povrchové napětí pomocí tenziometru. Měření povrchového napětí bylo založeno na metodě odtrhávání prstence od hladiny.

Bylo zjištěno, že pořadí při míchání roztoků má podstatný vliv na agregační vlastnosti systému a jeho vzhled. Dále byly zjištěny vlivy způsobu přípravy rozpouštěním práškového biopolymeru tenzidem a naopak a vlivy prostředí systému na polaritu systému. Bylo zjištěno, že roztok NaCl ruší vlivy interakcí v systému. Vliv způsobu přípravy určitých koncentrací systému CTAB ve fosforečném pufru se projevuje pouze nepatrně.

ABSTRAKT

To study the effect of the method of preparation of biopolymer-surfactant on the aggregation properties several experiments were designed. Closer investigation was made on native hyaluronan-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) system. The system has been studied in the phosphate buffer in aqueous and saline solutions. The effect of the order of substances addition in the samples, the influence of different methods of preparation of certain concentrations of the solutions or the effect of dissolving powdered biopolymer and surfactant on the contrary, the resulting system were investigated. Fluorescence intensity was measured for all prepared samples and its changes were investigated. Pyrene and Nile red were used as fluorescent probes. Some samples were also measured by tensiometer. Measurement of surface tension was based on the method of divorcing the ring from the surface.

It was found that the order of the mixing of solutions has a significant effect on the aggregation properties of the system and its appearance. Further effects were detected on the prepared samples by dissolving powdered biopolymer surfactants and vice versa, and environmental influences of the polarity of the system. It was found that sodium chloride abolished the effects of interactions in the system. Effect of method of preparation of certain concentration of CTAB in phosphate buffer is reflected only slightly.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzid, fluorescence, pyren, nilská červeň, povrchové napětí

KEYWORDS

hyaluronan, surfactant, fluorescence, pyrene, nile red, surface tension

KRUTIŠOVÁ, T. *Vliv způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid na agregační vlastnosti systému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 50 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za zaštitění mé práce a dále Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a Ing. Tereze Halasové za obětavou spolupráci, rady a dostatečné množství trpělivosti.

OBSAH:

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Polysacharidy	9
2.2	Kyselina hyaluronová, hyaluronan.....	9
2.2.1	Historie a chemická struktura.....	9
2.2.2	Polymerní struktura	10
2.2.3	Uspořádaná struktura v roztoku	11
2.2.4	Metabolismus a viskoelastické vlastnosti	11
2.2.5	Aplikace v medicíně.....	12
2.3	Disperzní soustava.....	12
2.4	Koloidní disperze	13
2.5	Asociativní micelární koloidy	13
2.5.1	Struktura micelárních koloidů.....	13
2.5.2	Micely a kritická micelární koncentrace	14
2.5.3	Solubilizace	15
2.5.4	Povrchové napětí micelárních koloidů.....	16
2.6	Fluorescence.....	16
2.6.1	Princip fluorescence, doba života a kvantový výtěžek fluorescence	16
2.6.2	Emisní a excitační spektrum fluorescence	18
2.6.3	Zákony a pravidla pro fluorescenci.....	18
2.6.4	Zhášení	19
2.6.5	Tvorba excimeru	19
2.7	Fluorescenční sondy	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Použité chemikálie	22
3.2	Postup přípravy vzorků a jejich měření.....	22
3.2.1	Příprava vzorků ředěním zásobních roztoků a přímou přípravou koncentrací	22
3.2.2	Výběr vhodného složení systému CTAB - hyaluronan.....	23
3.2.3	Práškový hyaluronan + roztok CTAB ve vodě a v roztoku NaCl.....	23
3.2.4	Práškový CTAB+ roztok hyaluronanu ve vodě a v roztoku NaCl.....	24
3.2.5	Směs prášků hyaluronan a CTAB + prostředí (voda nebo NaCl)	24
3.2.6	Metoda měření.....	24
3.3	Standardní vyhodnocení dat	25
3.3.1	Vyhodnocení dat vzorků obsahujících pyren	25
3.3.2	Vyhodnocení dat vzorků obsahujících nilskou červen.....	26
3.3.3	Vyhodnocení povrchového napětí.....	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1	Stanovení CMC CTAB v pufru připraveného ředěním zásobních roztoků nebo přímou přípravou koncentrací	27
4.2	Experimenty s práškovým CTAB a HyA a jejich roztoky.....	34
4.3	Shrnutí výsledků.....	40
5	ZÁVĚR.....	41
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	45
7.1	Seznam zkratk	45
7.2	Seznam symbolů	45
8	SEZNAM PŘÍLOH	46

9	PŘÍLOHY.....	47
9.1	Příloha 1	47
9.2	Příloha 2	48
9.3	Příloha 3	49
9.4	Příloha 4	50

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová – víceúčelová substance uvnitř lidského těla. Nejenže kyselina hyaluronová zajišťuje dokonalou hydrataci lidské pokožky a je součástí mnoha tkání, ale hraje velmi důležitou roli v hladké pohyblivosti kloubů a je také hlavní součástí očního sklivce. Udrží jeho správné vlastnosti, tak aby mohl plnit svoji funkci. Díky svým jedinečným vlastnostem se dnes tento biopolymer stává středem zájmu mnoha lékařských oborů přes kosmetiku, léčbu a prevenci kloubních onemocnění, oční lékařství, až k použití při léčbě onkologických pacientů.

Uplatnění kyseliny hyaluronové díky její biokompatibilitě a biodegradabilitě při léčbě rakoviny a s tím související cílená distribuce léčiv je v současné době předmětem mnoha výzkumů. Cílená distribuce léčiv by totiž mohla nahradit chemoterapii, která není lidským tělem dobře snášena, mohla by zajistit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním oběhu, řízenou aktivaci a také účinek léčiv selektivně zaměřený na cílovou tkáň.

Již před více než deseti lety byl objeven potenciál polymerních micel jako slibných nosičů léčiv. Polymerní micely jsou tvořeny syntézou blokových kopolymerů, jsou výrazně stabilní a jsou nosiči pro léky špatně rozpustné ve vodě a léky amfifilní, které mohou být solubilizovány ve vnitřním jádru micel. Díky jejich hydrofilnímu povrchu a malé velikosti vykazují delší dobu oběhu in vivo a hromadění v nádorových tkáních. Jejich vysoká molekulová hmotnost zabraňuje vylučování ledvinami [1, 2].

Dalším uvažovaným způsobem přípravy cílených nosičů léčiv je pomocí interakcí tenzidu a polyelektrolytu. Tyto agregáty jsou výhodné z hlediska vlastností obou složek. Tenzid tvoří hydrofobní doménu, ve které je možno solubilizovat léčivo. Hyaluronan zajišťuje vnější ochranu a možnost hromadění v nádorových tkáních [3].

Použití obou typů micel jako nosičů léčiv vyžaduje stanovení několika důležitých parametrů, které charakterizují proces vzniku těchto agregátů. Jedním takovým parametrem je kritická micelární koncentrace, která informuje o počátku tvorby micel.

Teoreticky může být ke stanovení kritické micelární koncentrace použita každá fyzikální vlastnost (např. mezifázové napětí, vodivost nebo osmotický tlak), která vykazuje náhlou změnu přímo při kritické micelární koncentraci nebo v její těsné blízkosti. Obvykle se jako ukazatel používá změna v průběhu těchto vlastností, která je funkcí koncentrace [1].

Existuje několik běžně používaných metod, jako je tenziometrie, konduktometrie, fluorimetrie, pro stanovení kritické micelární koncentrace. Preferovaná metoda ideální pro polymerní amfifilní látky ale i povrchově aktivní látky ovšem zahrnuje použití fluorescenčních sond. Fluorescenční sondy se prokázaly být vysoce užitečné pro sledování změn v mikroprostředí makromolekul nebo membrán. Obecně lze říct, že fluorescenční sondy, které obsahují elektronodonorné a elektronakceptorové substituenty na polyaromatickém kruhu, vykazují výraznou citlivost fluorescenční charakteristiky na polaritu prostředí. Na druhou stranu tyto polární skupiny představují významné orientační omezení. Tyto sondy nejsou schopny se zcela začlenit do hydrofobního jádra, ale zůstávají lokalizovány na rozhraní, a proto nejsou schopné přesně odrážet vnitřní polaritu hydrofobních domén. Nepochopitelně uhlovodíkové fluorofory jsou naopak snadno začleněny do hydrofobní domény a jejich fluorescenční parametry jsou velmi citlivé na změny polarit v jejich bezprostředním mikroprostředí [4]. Z fluorescenčních sond je snad nejpoužívanější pyren. Pyren je totiž z hlediska vlastností jeho emisního spektra považován za sondu se schopností odhadnout polaritní úroveň jeho prostředí, řekněme prostředí micely [5, 6].

Dobře rozlišená vibrační struktura emisního spektra pyrenu je nezávislá na podmínkách excitace nebo srážkovém zhášení, avšak vysoce závislá na polaritě rozpouštědla. Vibrační struktura je odlišná u alkanového, alkoholového rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel. Změny ve vibrační struktuře nastávají v celém spektru, avšak největší rozdíly se vyskytují u

vrcholů při 373 a 384 nm. V nepolárním prostředí dominuje pyrenovému emisnímu spektru vrchol při 384 nm, zatímco při vyšších polaritách je nejintenzivnější vrchol při 373 nm. Vyjádřením poměru intenzity fluorescence při těchto dvou vrcholech získáváme parametr velmi citlivý na polaritu rozpouštědla [5, 4, 6].

Je dobře známo, že polymer a povrchově aktivní látka spolu ve vodném roztoku tvoří komplexy. Byl studován vliv teploty nebo další přidané látky (např. NaCl) na interakce mezi polymerem a povrchově aktivní látkou, jakožto velmi důležité parametry pro pochopení stavu povrchově aktivní látky oproti polymeru ve vodném roztoku. Velmi konkrétně byly sledovány interakce mezi polyvinylpyrolidonem (PVP) a dodecylsulfátem sodným (SDS) pomocí různých metod jako např. pomocí povrchového napětí nebo solubilizace [7]. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací NaCl se kritická micelární koncentrace výrazně snižuje a interakce mezi alkylsulfátem sodným a PVP se stávají jasnějšími s rostoucím množstvím přidané soli, stejně jako s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce alkylsulfátu sodného [7, 8].

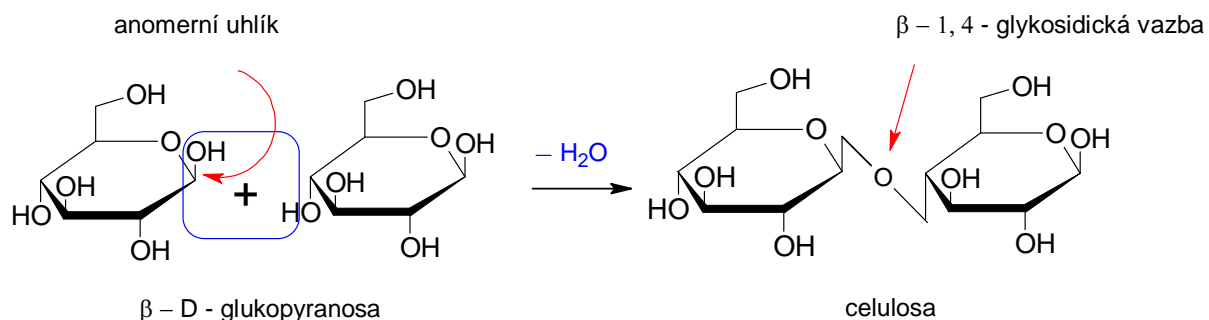
Systém biopolymer-tenzid patří mezi ohromně dynamické systémy, které jsou velmi závislé na teplotě, poměrném složení systému a velmi závislé na vnějších podmínkách. Je tedy logické, že by systém biopolymer-tenzid a tedy i agregáty jako polymerní micely měly být ovlivněny způsobem jejich přípravy. I přes neutuchající zájem o hyaluronan a jeho využití jako nosiče léčiv nebyl dosud podrobně studován vliv způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid na agregační chování tohoto systému.

Nejen z tohoto důvodu se následující práce zabývá studiem vlivu způsobu přípravy systému biopolymer-tenzid s ohledem na jeho agregační chování. Za konkrétní kombinaci byl zvolen hyaluronan a cetyltrimetylamonium bromid. Je zkoumán vliv pořadí složek při míchání systému či vliv různých způsobů přípravy konkrétní koncentrace složek v systému. Cílem této práce by měl být základní nástin různých způsobů přípravy na agregační chování systému. Změny v tomto chování a tedy i příprava systému jsou totiž velmi důležité parametry pro hodnocení celkového chování systému.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polysacharidy

Polysacharidy jsou přírodní polymery s obecným složením $(C_6H_{10}O_5)_n$. Makromolekuly polysacharidů jsou tvořené více než 10 (obvykle však stovkami až tisíci) monosacharidových jednotek, které jsou spojeny glykosidickými vazbami. Tyto vazby vznikají reakcí dvou hydroxylů, kdy reaguje poloacetalová skupina za uvolnění molekuly vody a zbylé molekuly se spojují prostřednictvím glykosidické vazby (viz Obr. 1).



Obr. 1: Vznik β -1,4 glykosidické vazby

Řetězce polysacharidů mohou být větvené nebo nevětvené (lineární). U lineárních polysacharidů jsou monosacharidové jednotky spojeny 1,4-glykosidickou vazbou. U větvených jsou hlavní řetězce spojeny 1,4-glykosidickou vazbou a vedlejší řetězce 1,6-glykosidickou vazbou. Polysacharidy se dále dělí na homopolysacharidy (homoglykany), které jsou tvořeny jediným druhem monosacharidu a heteropolysacharidy (heteroglykany) obsahující více typů monosacharidů.

Polysacharidy patří mezi biologické polymery, které hrají důležité role ve většině živých organismů. Mezi jejich nejdůležitější funkce patří funkce stavební (celulosa, chitin, pektin...). Dále polysacharidy fungují jako zdroj energie pro různé biochemické reakce (škrob, fruktany) nebo se mohou zúčastňovat dalších specifických procesů v organismu, např. ovlivňují srážlivost krve (heparin) nebo ovlivňují hospodaření s vodou. Polysacharidy se tedy vyznačují odlišnými vlastnostmi, přičemž na jejich tvorbě se podílí pouze několik monosacharidů a jejich derivátů; převážně se jedná o D-glukosu, D-galaktosu, D-mannosu, D-xylosu, D-galakturonovou kyselinu a pár dalších. Tyto monosacharidy se vyskytují jako α nebo β anomery a jsou nejčastěji vázány 1,4-glykosidickými vazbami. Zejména stavební polysacharidy jsou lineární, avšak obecně mohou být polysacharidy více či méně větveny [9].

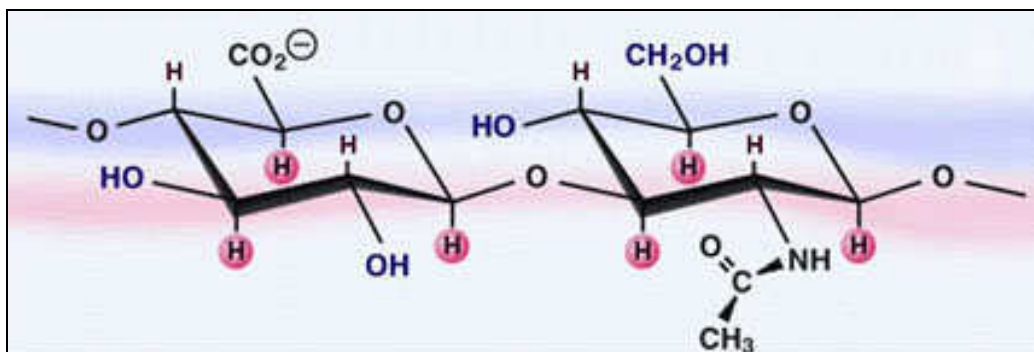
2.2 Kyselina hyaluronová, hyaluronan

2.2.1 Historie a chemická struktura

V roce 1934, Karl Meyer a jeho asistent John Palmer popsali postup pro izolaci nového glukosaminoglykanu z očního sklivce skotu, který obsahoval kyselinu močovou, aminoglykan a neobsahoval sulfoestery. Tato neznámá látka byla pojmenována jako kyselina hyaluronová, čímž byla označena jedna z nejuniverzálnějších a fascinujících makromolekul v přírodě. Dnes je tato makromolekula nejčastěji nazývána jako hyaluronan, což odráží skutečnost, že existuje *in vivo* jako polyanion, a ne v protonované formě kyseliny. Názvem hyaluronan také rozumíme sodnou nebo draselnou sůl kyseliny hyaluronové.

Molekula hyaluronanu má nerozvětvenou lineární strukturu a vysokou molekulovou hmotnost ($10^5 - 10^7$ Da). Chemickou strukturu molekuly tvoří opakující se disacharidové jednotky. Tyto jednotky obsahují D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin, které

jsou spojeny pomocí střídajících se β -1,4 a β -1,3 glykosidických vazeb. Oba cukry jsou prostorově spojeny glukózou, která v β konfiguraci dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco malé vodíkové atomy obsazují méně stericky výhodné axiální polohy (Obr. 2). Toto je hlavní důvod, proč je struktura molekuly energeticky velmi stabilní [10, 11].

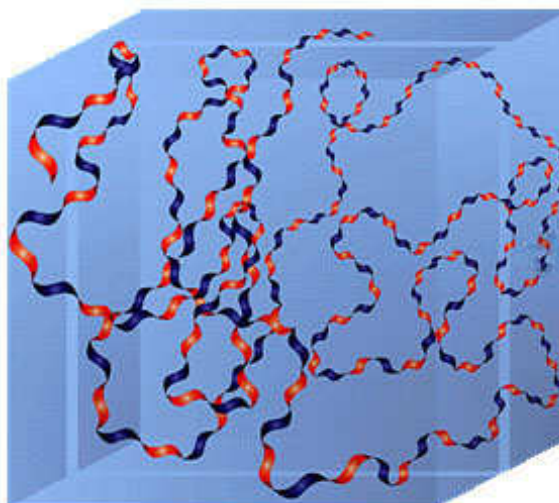


Obr. 2: Základní struktura molekuly hyaluronanu – opakující se disacharidová jednotka [10]

2.2.2 Polymerní struktura

Enzymy syntetizující hyaluronan vytvářejí velké lineární polymery s opakující se disacharidovou jednotkou. Počet opakujících se disacharidových jednotek v konečné molekule hyaluronanu může dosáhnout 10 000 nebo více, molekulová hmotnost je pak kolem 4 miliony Da. Molekula hyaluronanu (10 000 disacharidových jednotek) může mít délku až 10 μm .

Ve fyziologickém roztoku je páteř hyaluronanu vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku formují nepolární, relativně hydrofobní domény, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní domény, čímž se vytváří zkroucená stuhovitá struktura. Následkem toho se u molekuly hyaluronanu předpokládá ve fyziologickém roztoku roztažená nepravidelná spirálovitá struktura, která zabírá širokou oblast.



Obr. 3: Struktura hyaluronanu v roztoku [10]

Doménová struktura hyaluronanu má zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny se mohou volně šířit rozpouštědlem uvnitř domény. Velké molekuly, jako bílkoviny, budou částečně vyloučeny z domény kvůli jejich hydrodynamické

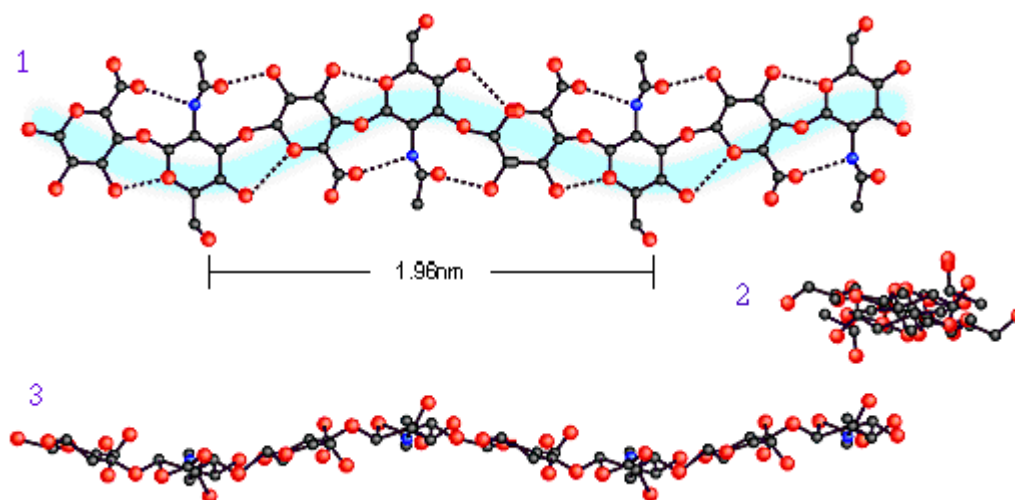
velikosti v roztoku. Hyaluronanové sítě v doméně poskytují méně prostoru pro jiné molekuly, které jsou větší. To vede k pomalejší difúzi makromolekul skrz sítě a jejich nižším koncentracím v síti ve srovnání s volnými prostory v okolí hyaluronanu.

Hyaluronanové řetězce se v roztoku neustále pohybují, což způsobuje neustálou změnu velikosti efektivních pórů v síti. Statisticky mohou existovat všechny velikosti pórů, jen s různou pravděpodobností, což znamená, že všechny molekuly mohou projít hyaluronanovou sítí, ale s různým stupněm zpomalení v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [10].

2.2.3 Uspořádaná struktura v roztoku

Řetězce hyaluronanu obsahují dva typy vazeb – vazby v sacharidových jednotkách a vazby mezi jednotkami. Sacharidové jednotky si udržují relativně stálý tvar. Mezi těmito rigidními jednotkami existují glykosidické vazby, které sestávají z atomu kyslíku spojujícího jednotlivé cukry. Tyto atomy kyslíku přispívají dvěma vazbami, jež jsou orientovány jako ramena písmene V. Substituenty připojené na koncích ramen se mohou otáčet o 360 stupňů. Ačkoli není možná úplná svoboda ve vytváření konfigurací substituentů okolo atomu kyslíku, přesto každý glykosidický můstek poskytuje několik možných konfigurací. Vynásobením těchto možností počtem můstků v dlouhém řetězci získáme obrovské množství tvarů jedné molekuly. Uspořádání molekuly vypadá jako náhodné, ale není tomu tak.

Struktura má tvar dvojnásobné spirály (ne dvojšroubovice, do níž jsou zapojeny dva molekulární řetězce), ve které hraje důležitou roli voda jako stabilizační faktor. Tato jakoby pásková struktura vykazuje mírná zakřivení jak v průmětu, tak v prostorové projekci (viz Obr. 4) [11].



Obr. 4: Struktura hyaluronanu v roztoku; 1 - průmět, 2 – pohled podél osy dvojnásobné spirály, 3 – prostorová projekce [11]

Význam této sekundární struktury spočívá v tom, že dvojitá spirála obsahuje rozsáhlou hydrofobní oblast o velikosti osmi uhlíkových atomů, což je přibližně stejná velikost jakou má oktanová kyselina. Hyaluronan má tudíž vlastnosti vysoce hydrofilního materiálu současně s hydrofobními doménami charakteristickými pro lipidy. Jedná se tedy o amfifilní molekulu [11].

2.2.4 Metabolismus a viskoelastické vlastnosti

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celou dobu životnosti tkáně. Syntéza je většinou vyvážena s rozkladem, čímž se udržuje konstantní koncentrace hyaluronanu v tkáni. Poločas rozkladu molekuly hyaluronanu v chrupavce je obvykle

2-3 týdny. Poločas rozpadu hyaluronanu v krvi je překvapivě krátký, jen několik minut. V některých případech však převládá syntéza nebo rozklad hyaluronanu. Příkladem mohou být kožní buňky, ve kterých převažuje syntéza. Odhaduje se, že téměř jedna třetina z celkového množství hyaluronanu v lidském těle je metabolicky odstraněna a nahrazena během průměrného dne.

Koncentrace hyaluronanu v tkáních je často vyšší než by se dalo očekávat. V mnoha případech je hyaluronan organizován do extracelulární matrix pomocí specifických interakcí s ostatními makromolekulami v matrix. Vysokomolekulární hyaluronan ve vysokých koncentracích v roztoku může tvořit zapletené molekulární sítě díky sterickým interakcím a vlastní asociaci mezi jednotlivých molekulami. Druhý případ může nastat, když úsek hydrofobní části kostry molekuly interaguje reverzibilně s hydrofobním povrchem na srovnatelném úseku jiné molekuly nebo v jiné části té stejné molekuly. Takové sítě vykazují odlišné vlastnosti, než izolované molekuly hyaluronanu. Mohou vzdorovat rychlému, krátce trvajícímu proudění tekutin pryč, a tím vykazují elastické vlastnosti, které mohou rozložit zatížení nebo smykové síly v rámci sítě. Na druhé straně, pomalé proudění tekutin delší dobu může částečně oddělit a srovnat molekuly, čímž se povoluje pohyb a projev viskózních vlastností molekul [10].

2.2.5 Aplikace v medicíně

Hyaluronan má vysokou kapacitu pro zadržování vody a vysokou viskoelasticitu, čímž se stává vhodnou látkou pro různé druhy lékařských a farmaceutických aplikací. V každodenním životě se nachází řada produktů obsahujících hyaluronan.

První lékařskou aplikací hyaluronanu bylo doplnění nebo nahrazení sklivce v oční chirurgii. Hyaluronan byl původně izolován z lidské pupeční šňůry a krátce poté byla z kohoutích hřebínků izolována vysokomolekulární forma. Preparát z kohoutích hřebínků je v současné době široce používán v oční chirurgii. Jiné formy hyaluronanu jako je např. kovalentní zesíťovaná forma byly vyvinuty pro použití jako doplněk kloubního mazu při osteoartritidě kloubů [10].

2.3 Disperzní soustava

Disperzní soustava je soustava, která obsahuje alespoň dva druhy hmoty, přičemž jeden druh je rozptýlen ve druhém ve formě více nebo méně jemných částic. Rozptýlený druh se nazývá disperzní podíl, spojitý druh disperzní prostředí. Pod pojmem druh hmoty se rozumí složka nebo fáze. Disperzní podíl může i nemusí představovat samostatnou fázi a svým chemickým složením se může, ale nemusí vždy lišit od disperzního prostředí. Podle toho mluvíme o disperzní fázi nebo disperzní složce. V roztocích představuje disperzní prostředí rozpouštědlo a disperzní podíl rozpuštěná látka. Převážná většina disperzí patří mezi vícesložkové soustavy [13, 14].

Povahu disperzního systému ovlivňuje řada faktorů. Především je to velikost disperzních částic a počet fází v systému, a dále tvar částic, interakce mezi částicemi a disperzním prostředím a vzájemné interakce mezi částicemi, povrchové a elektrické vlastnosti částic, skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu. Disperze jsou rozdělovány podle velikosti částic na

- analytické disperze s velikostí částic menší než 1 nm
- koloidní disperze s velikostí částic od 1 nm do 1 µm
- mikrodisperze s velikostí částic od 1 µm do 10 µm
- makrodisperze s velikostí částic nad 10 µm.

Mezi jednotlivými typy je však plynulý přechod, nejedná se o ostře oddělené skupiny [12].

2.4 Koloidní disperze

Částice koloidního systému se chovají stejným způsobem jako molekuly v pravých roztocích – vykonávají chaotický termický pohyb, mění vzájemnými srážkami i srážkami s molekulami disperzního prostředí směr i rychlost pohybu. Tento pohyb, který je možno pozorovat v ultramikroskopu, se nazývá Brownův pohyb. Jeho intenzita roste se stupněm disperzity, protože se zvětšuje počet částic a tím také počet vzájemných srážek. Stejný vliv má vzrůst stupně disperzity na osmotický tlak vyvolaný částicemi [12].

Vlastností která odlišuje koloidní soustavy od pravých roztoků je, že způsobují rozptyl světla procházejícího roztokem. Světlo odrážející se od jednotlivých částic způsobuje, že jsme schopni vidět dráhu paprsku. Toto rozptylování světla se nazývá Tyndallův efekt [13].

Charakteristickou vlastností koloidních systémů je schopnost tvořit gely – systémy tvořené sítí, která vytváří souvislou strukturu, prostupující celým disperzním prostředím. Spojité je zde nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl.

Vzhledem k velké rozmanitosti je účelné rozdělovat koloidně disperzní systémy do tří skupin:

- Lyofobní disperze (koloidní disperze) – heterogenní systémy, v nichž disperzní podíl a disperzní prostředí představují dvě různé fáze. Tyto fáze jsou odděleny fázovým rozhraním, které výrazně ovlivňuje jejich vlastnosti. Vznikají z hrubých disperzí umělým dispergováním nebo z pravých roztoků srážením na částice koloidní velikosti. Jsou termodynamicky nestálé, samovolně zanikají.
- Lyofilní koloidy (koloidní roztoky) – homogenní koloidní systémy, v nichž disperzní podíl tvoří s disperzním prostředím jednu fázi. Jsou to pravé roztoky makromolekul, které vznikají samovolným rozpouštěním a jsou termodynamicky stálé. Samovolný vznik je podmíněn afinitou makromolekul k disperznímu prostředí.
- Asociativní (micelární) koloidy – vznikají samovolnou reverzibilní asociací nízkomolekulárních látek s amfifilní strukturou v pravém roztoku. Mezi molekulami v roztoku a vzniklými asociály se ustavuje rovnováha [12].

2.5 Asociativní micelární koloidy

Ve vhodném rozpouštědle poskytují některé nízkomolekulární látky ve velkých zředěních pravé roztoky, ale od určité koncentrace asociují jejich molekuly do té míry, že vytvářejí částice koloidních rozměrů. Tyto útvary se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, označujeme jako micelární neboli asociativní koloidy [14].

2.5.1 Struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul. Asociující molekuly musí obsahovat skupiny, které svou velkou afinitou k rozpouštědлу zaručují značnou rozpustnost, a aby současně druhá část molekuly byla sama o sobě v daném prostředí nerozpustná. Takové molekuly se nazývají amfipatické nebo amfifilní.

Látky s výše popsanou strukturou jsou označovány jako povrchově aktivní látky (PAL) neboli tenzidy. Tyto látky jsou podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku rozdělovány na ionogenní (aniontové, kationtové, amfoterní) a neionogenní neboli neutrální. Aniontové PAL disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Nejvýznamnějšími představiteli této skupiny jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin. Kationtové PAL tvoří při disociaci ve vodě povrchově aktivní kationty. Současná přítomnost aniontových a kationtových PAL ve vodném roztoku obvykle není možná, neboť v takovém roztoku se z velkého kationtu a velkého aniontu vytváří velmi slabě disociující sůl o velké molární hmotnosti, která je prakticky nerozpustná. U amfoterních PAL náboj micely závisí na pH. Amfipatické neionogenní PAL nejsou schopné elektrolytické disociace. Skládají se z dlouhého

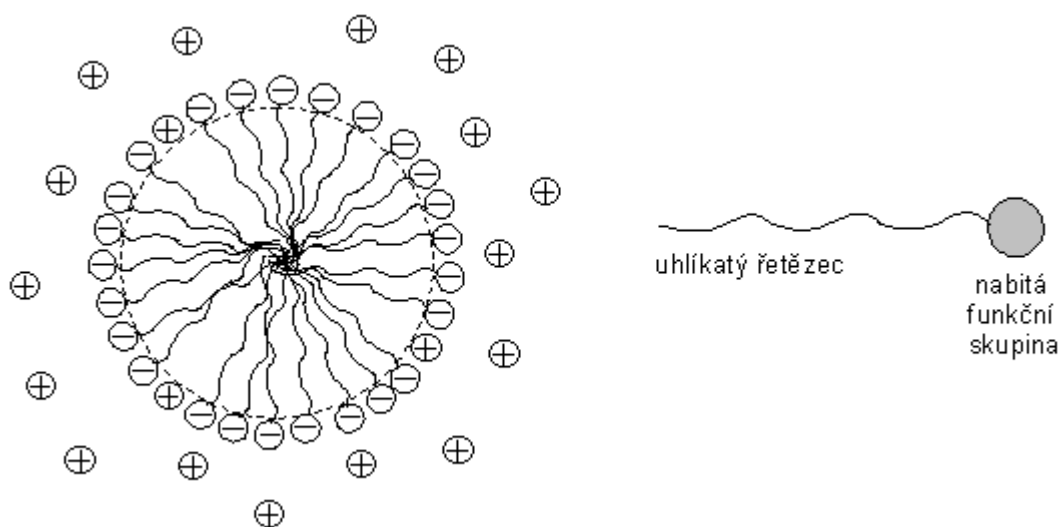
uhlovodíkového řetězce s několika polárními, ale neionogenními skupinami na konci, které zajišťují rozpustnost těchto sloučenin [12].

2.5.2 Micely a kritická micelární koncentrace

Asociativní povrchově aktivní látky tvoří ve velkých zředěních pravé roztoky. Při určité koncentraci, označované jako **kritická micelární koncentrace** (z angl. CMC) v systému dojde samovolně k agregaci molekul rozpuštěné látky do útvarů koloidní velikosti, nazývaných **micely**. Pod touto koncentrací je PAL v systému pouze ve formě jednotlivých molekul, nad ní všechny přidávané molekuly PAL asociují do micel. CMC je tedy nejvyšší možná koncentrace, při níž je PAL v roztoku v molekulové (iontové) formě. Jde o jeden z nedůležitějších hodnotících parametrů u asociativních koloidů. Hodnota CMC je ovlivňována zejména délkou řetězců tenzidů a jejich strukturou, teplotou nebo vlastnostmi rozpouštědla. U neionogenních tenzidů je zpravidla menší než v případě ionogenních tenzidů [12].

Zředěné roztoky micelární koloidů se vyznačují typickým průběhem závislostí různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ty vykazují zlomy, které u jiných roztoků nepozorujeme. Tento zlom potvrzuje skutečnost, že v roztoku došlo při CMC k významným změnám. Například povrchové napětí se s rostoucí koncentrací prudce zmenšuje až do CMC a při jejím překročení se již téměř nemění. Molární vodivost nejprve mírně klesá a po dosažení CMC nastává prudký pokles. Také koncentrační závislosti hustoty a viskozity vykazují zlomy, i když u těchto vlastností už nejsou tak výrazné [12, 14].

Při postupném rozpouštění tenzidu se hydrofobní části amfifilních molekul snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím. Nejprve se tyto molekuly samovolně hromadí na povrchu kapaliny a orientují se hydrofobními částmi z roztoku a hydrofilními částmi do roztoku. V okamžiku, když je celá plocha povrchu tekutiny nasycena molekulami tenzidu, nemohou se už další molekuly v povrchové vrstvě hromadit. V této chvíli bylo dosaženo CMC. Po překročení CMC dochází již ke vzniku agregátů – micel. Ve vodném prostředí tvoří jádro micely navzájem propletené nepolární uhlovodíkové řetězce molekul PAL, které se stále snaží minimalizovat kontakt s vodným prostředím, a proto se orientují navzájem k sobě. Na vnějším povrchu micely jsou rozmístěny polární skupiny (hydrofilní části molekul). Jde-li o ionogenní PAL, polární skupiny disociují. Vznikají nabité micely obklopené elektrickou dvojvrstvou tvořenou disociací vzniklými protiionty [12].



Obr. 5: Struktura stabilní micely s iontovou atmosférou

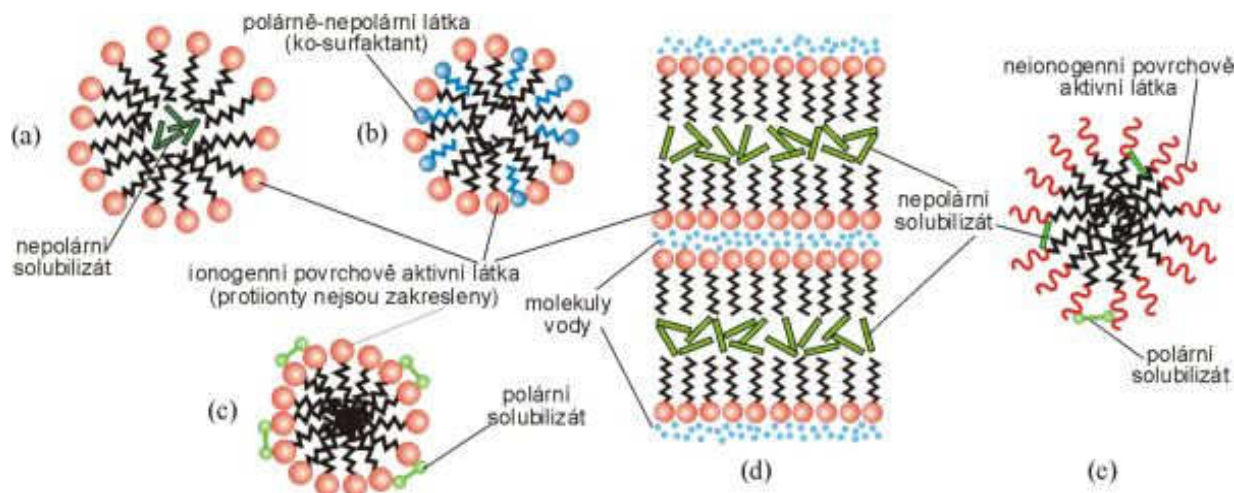
Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, molekulární struktuře PAL, charakteru mezimolekulárních sil atd. Ve zředěných vodných roztocích nad CMC vznikají malé kulovité (sférické) agregáty, v koncentrovaných roztocích jsou přítomny i micely jiného tvaru. S rostoucí koncentrací roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se v nich stále více orientují navzájem rovnoběžně až do vzniku laminárních micel složených ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci a ionogenní skupiny směřují ven.

Asociační (agregační) číslo udává počet molekul PAL, které tvoří asociativní micelu. Závisí na několika faktorech. Je ovlivněno fyzikálními podmínkami, roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Tato plocha závisí nejen na velikosti polární skupiny, ale také na odpuzivých silách, kterými na sebe sousední povrchové skupiny případně působí [12].

2.5.3 Solubilizace

Významnou vlastností micelárních koloidů, která souvisí se stavbou jejich micel, je solubilizace. Jedná se o schopnost rozpouštět i látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Mechanismus solubilizace může být různý. Nepochopitelné látky se rozpouštějí v jádru micely (Obr. 6a), polárně-nepochopitelné organické látky (alkoholy, aminy) se rozmísťují v miscelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze (Obr. 6b). Solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu (Obr. 6c). V laminárních micelách vstupuje organická látka do micely, rozmísťuje se mezi uhlovodíkovými konci molekul a tím se vrstvy molekulových řetězců od sebe oddalují (Obr. 6d).

Při solubilizaci roste hmotnost micel PAL nejen v důsledku molekul solubilizátu zabudovaných do micely, ale také proto, že solubilizací se zvětší objem hydrofobního jádra a musí se tedy zvětšit i počet molekul PAL tvořících micelu [12].



Obr. 6: Solubilizace (a), (b), (c) malými micelami, (d) laminárními micelami

Solubilizace má velký praktický význam. Na jejím principu pracují čisticí a prací prostředky a užívá se jí např. ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu. Praktické využití má ovšem i pro výzkum PAL a tedy i hyaluronanu. Díky solubilizaci je možné vpravit do hydrofobního jádra různé látky, včetně fluorescenčních sond. Systém vzniklý tímto způsobem je možné zkoumat např. pomocí fluorimetrie.

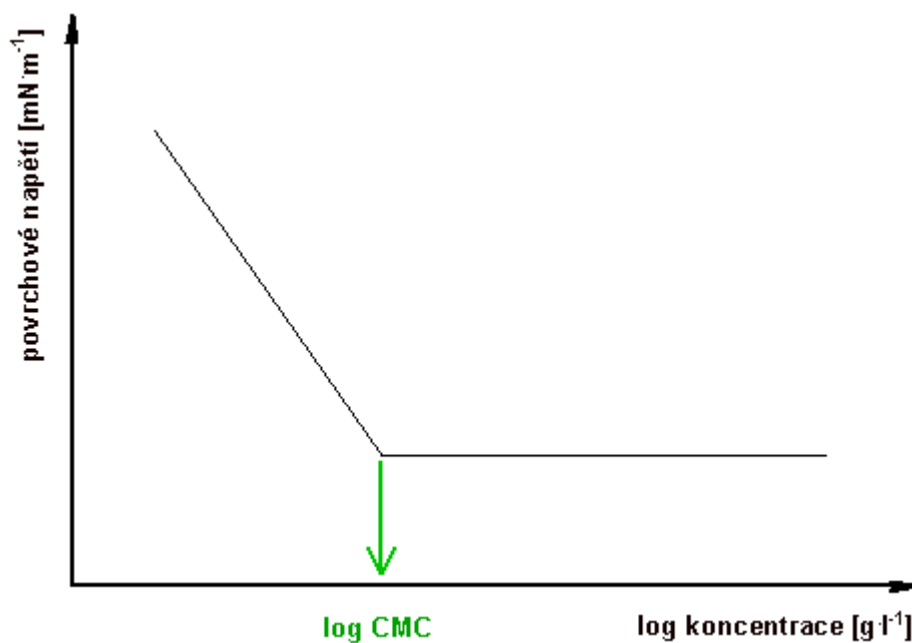
2.5.4 Povrchové napětí micelárních koloidů

Povrchové napětí je síla, která působí ve směru tečny k povrchu na úsečku jednotkové délky, jedná se tedy o mezifázové napětí kapalina - plyn. Z jiného hlediska je povrchové napětí efekt, při kterém se povrch kapaliny chová jako elastická fólie a snaží se dosáhnout co možná nejhladšího stavu s minimální plochou. Povrch tekutiny se tedy snaží dosáhnout stavu s minimální energií. Povrch kapaliny se chová tak, jako by byl tvořen velmi tenkou pružnou vrstvou, která se snaží stáhnout povrch tak, aby měl při daném objemu kapaliny co nejmenší plochu. Pokud by na kapalinu nepůsobily žádné vnější síly, pak by měla kulový tvar.

Povrchové napětí je silně závislé na teplotě a všeobecně platí, že klesá s rostoucí teplotou. Od kritického bodu je rovno nule.

PAL se ve vodném roztoku adsorbují ve fázovém rozhraní s plynnou fází. Vytváří se monomolekulární adsorpční vrstva, ve které mají amfifilní molekuly tendenci k orientaci. Polární skupiny směřují do vodné fáze, nepolární zbytky pak do plynné. Povrch roztoku se tedy ze strany plynné fáze jeví více nebo méně nepolární a povrchové napětí je tím sníženo. Povrchové napětí vodného roztoku PAL pak klesá s rostoucí koncentrací.

Micelární koloidy se v oblasti pod CMC chovají jako typické PAL. Povrchové napětí klesá velmi rychle s koncentrací a při dané koncentraci je povrchové napětí tím nižší, čím delší je nepolární řetězec. Po dosažení CMC se však pokles povrchového napětí prakticky zastavuje (viz Obr. 7) [14].



Obr. 7: Závislost povrchového napětí na logaritmu koncentrace roztoku

2.6 Fluorescence

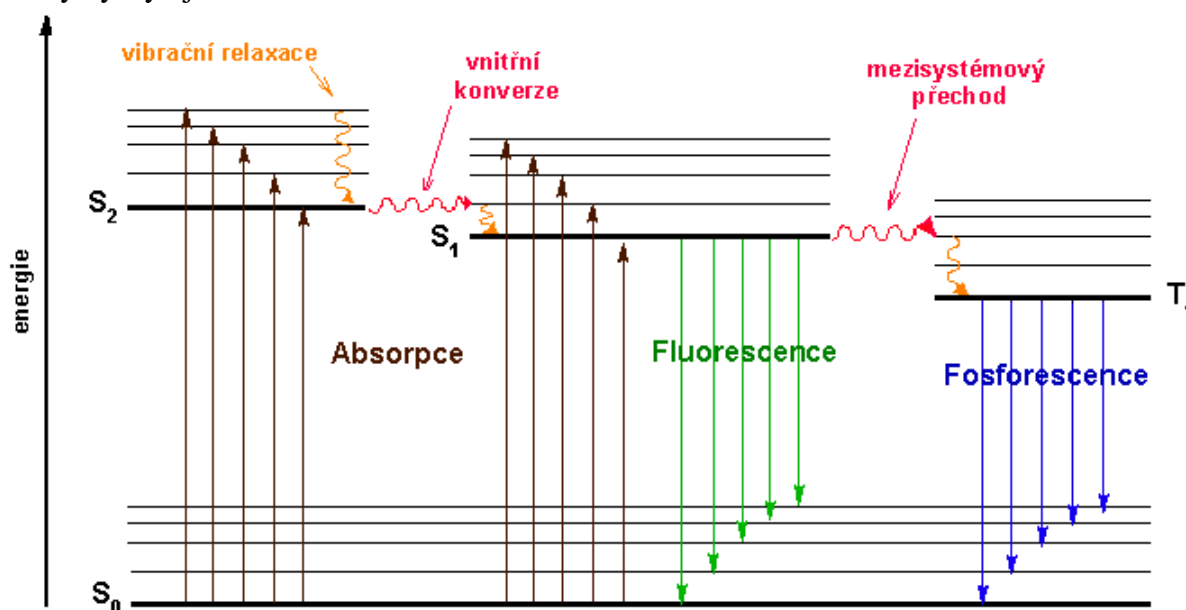
2.6.1 Princip fluorescence, doba života a kvantový výtěžek fluorescence

Po absorpci světla organickou molekulou v základním stavu (S_0) dojde k excitaci elektronu. Elektron přeskočí z nízko ležícího orbitalu do nejbližšího volného orbitalu s vyšší energií. Tímto způsobem může dojít k vytvoření buď singletového nebo tripletového excitovaného stavu. V případě singletového stavu (S_1) jsou spiny obou elektronů antiparalelní. Vytvoření takového stavu je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější. V případě tripletového stavu (T_1) jsou spiny obou elektronů orientovány paralelně.

Procesy, které se objevují mezi absorpcí a emisí světla jsou obvykle ilustrovány pomocí Jablonského diagramu (Obr. 8), který také znázorňuje molekulární procesy, k nimž může dojít v excitovaném stavu. Zářivé procesy jsou charakterizovány vyzářením fotonu a jsou v diagramu označeny jako přímé šipky. Nezářivé procesy se uskutečňují mezi vibračně-rotačními hladinami různých elektronových stavů, nemění se při nich celková energie systému a tudíž nedochází k emisi záření. V diagramu jsou nezářivé procesy označeny vlnovkami.

Jakmile je molekula excitována po absorpci fotonu, může se zbavit přebytečné energie, a tím se vrátit do základního stavu různými neexcitačními procesy. Jedná se buď o fotochemické reakce nebo o nezářivé přechody, při kterých se zvýší tepelná energie systému. Nejdůležitější jsou však procesy zářivé, při kterých dochází k emisi světla, což znamená vyzáření světelného kvanta. Obecně se tyto procesy nazývají luminiscence. Luminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií - fosforescence a fluorescence - v závislosti na povaze excitovaného stavu. Fosforescence je přechod z energeticky vyššího T_1 do energeticky nižšího stavu S_0 . Fluorescence je důsledkem spinově dovoleného přechodu obvykle z rovnovážné hladiny stavu S_1 do některé vibrační hladiny základního stavu S_0 .

Dalšími cestami, které konkurují fluorescenci jsou např. vnitřní konverze, nezářivé přechody (případně následované fluorescencí), intramolekulární přenos a konformační změny. Interakce s jinými molekulami v excitovaném stavu mohou také konkurovat deexcitací. Příkladem takových interakcí mohou být přesuny elektronů a protonů, přenos energie nebo tvorba excimeru nebo exciplexu. Tyto deexcitační dráhy mohou konkurovat fluorescenční emisi, pokud probíhají v časovém měřítku srovnatelném s průměrnou dobou, během které se molekuly vyskytují v excitovaném stavu.



Obr. 8: Jablonského diagram

Fluorescence je však nejpravděpodobnějším deexcitačním procesem. Lze ji pozorovat po celou dobu buzení, ale po jeho ukončení prakticky ihned zmizí. **Doba života** (τ_0) fluorescence je průměrný čas mezi jeho excitací a návratem do základního stavu; je jednou z nejdůležitějších vlastností fluoroforů a vyjadřuje se vztahem

$$\tau_0 = \frac{1}{\sum_i k_i}, \quad (1)$$

kde k_i je rychlostní konstanta reprezentující deaktivací procesy.

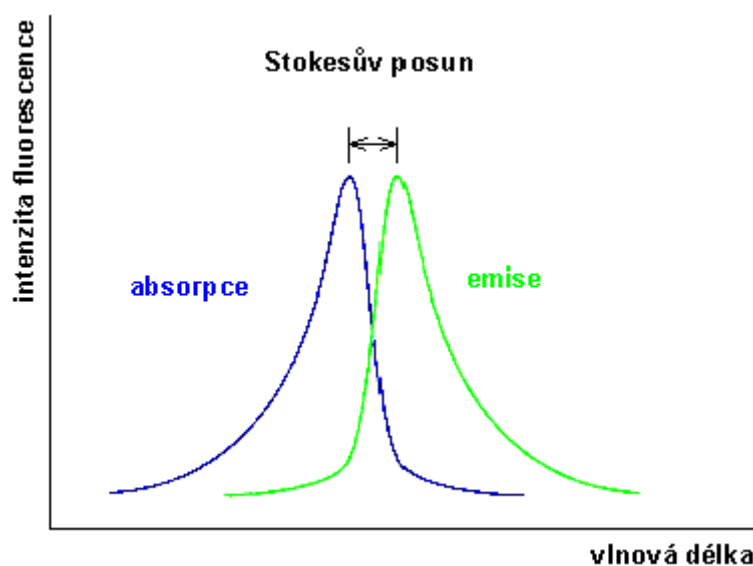
Druhou nejdůležitější vlastností fluoroforů je **kvantový výtěžek fluorescence**. Jedná se o podíl intenzity fluorescence I_F a intenzity absorbovaného světla I_A :

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} = \frac{k_r}{\sum_i k_i}, \quad (2)$$

kde k_r značí rychlostní konstantu fluorescence [15].

2.6.2 Emisní a excitační spektrum fluorescence

Obě spektra jsou zaznamenávány pomocí spektrofluorimetru. Zdrojem světla je lampa vyzařující konstantní tok fotonů, tj. konstantní množství fotonů za jednotku času, bez ohledu na jejich energii. **Excitační spektrum** je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření. **Emisní spektrum** je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření. Emisní spektrum je charakteristické pro dané sloučeniny. Bývá zrcadlovým obrazem spektra absorpčního, což je způsobeno tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Rozdíl mezi energií maxima prvního absorpčního pásu a emisního spektra se nazývá **Stokesův posun**. Tento důležitý parametr může poskytnout informace o excitovaném stavu. Např. když je dipólový moment fluoreskující molekuly vyšší než v základním stavu, Stokesův posun zvyšuje polaritu rozpouštědla. S důsledky tohoto jevu se musí počítat při odhadu polarit fluorescenčních sond.



Obr. 9: Zrcadlová symetrie absorpčního a emisního pásu

2.6.3 Zákony a pravidla pro fluorescence

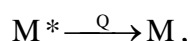
Fluorescence je řízena několika pravidly. Prvním z nich je **Stokesův zákon**, který říká, že vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je vždy větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). V praxi to znamená, že excitační světlo ztratí část své energie, což se projeví prodloužením vlnové délky emitovaného záření.

Druhým pravidlem je **Kashovo pravidlo**, podle něhož dochází před emisí fluorescenčního kvanta k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže nastává fluorescenční přechod z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 . Důvodem je, že energetický rozdíl mezi vyššími excitovanými stavy a stavem S_1 je malý, nežádivé přeměny z těchto stavů do základního stavu probíhají velmi rychle.

Třetím principem je **Vavilův zákon**, který tvrdí, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence a to, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.

2.6.4 Zhášení

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního spektra. Může být důsledkem různých procesů odehrávajícími se různými mechanismy. Jejich základní princip vystihuje obecné schéma:



kde M^* vyjadřuje excitovaný stav molekuly, M základní stav molekuly a Q označuje zhášec.

Srážkové (dynamické) zhášení nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tzn. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od **statického zhášení**, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří nefluorescenční komplex. **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké hustotě značení.

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno Sternovou-Volmerovou rovnicí:

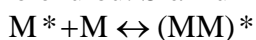
$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 C_q, \quad (4)$$

kde Φ_0 kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla, Φ je kvantový výtěžek fluorescence za přítomnosti zhášedla o koncentraci C_q , τ_0 je doba dohasínání fluorescence bez zhášedla, τ je doba dohasínání v přítomnosti zhášedla a k_q označuje bimolekulární zhášecí konstantu (tj. bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

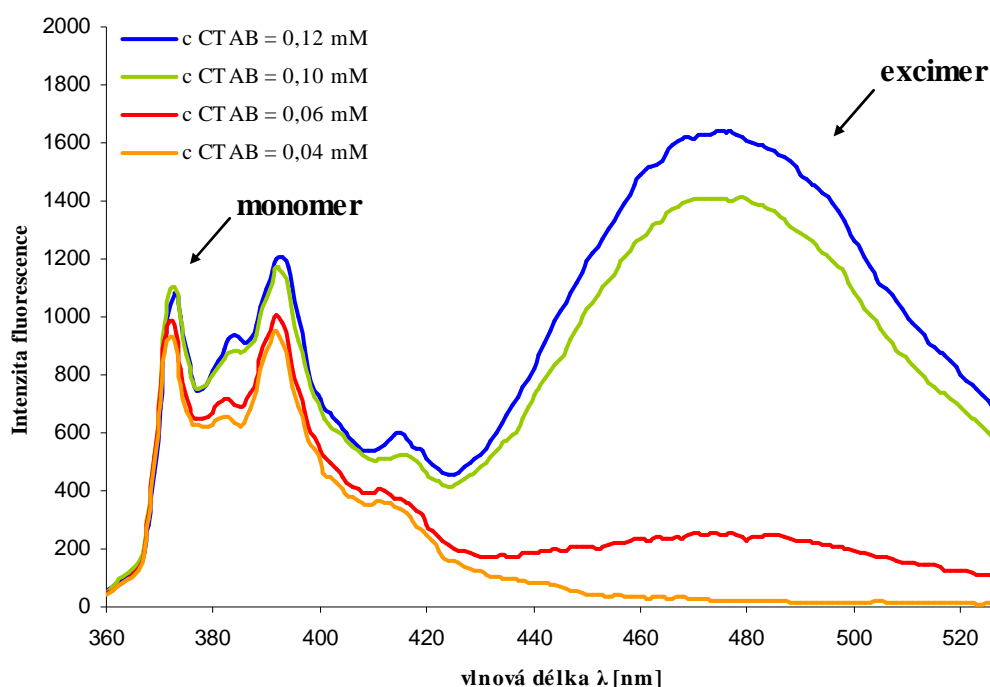
Široká škála látek působí jako zhášec fluorescence. Jedním z nejlepších známých unášeců je molekulární kyslík (O_2), který zháší všechny známé fluorofory. Dále fluorescence zhášejí např. atomy halogenů jako je bróm a jód nebo aromatické a alifatické aminy.

2.6.5 Tvorba excimeru

Excimer je dimer v excitovaném stavu (termín excimer je zkratkou spojení „excitovaný dimer“). Jedná se o stechiometrický komplex, který je vytvářen při srážce mezi excitovanou molekulou a stejnou neexcitovanou molekulou. Srážku molekul popisuje schéma:



Pokud dochází v systému se zvyšováním koncentrace látky ke snižování fluorescence, je za zhášení fluorescence zodpovědná např. právě tvorba excimeru. Funkci zhášec na sebe přebírá samotná molekula fluoreskující látky (např. pyren). Zhášení vlivem tvorby excimeru je tedy druhem samozhášení. Excimer je charakterizován v emisním spektru vlastním pásem. Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k vyšším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul. Na rozdíl od monomerního emisního pásu nevykazuje excimerový pás vibrační strukturu. Intenzita fluorescence excimeru v emisním spektru roste na úkor fluorescence monomeru.



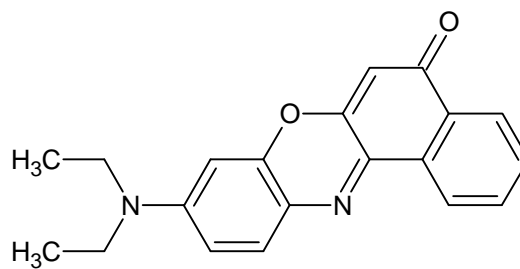
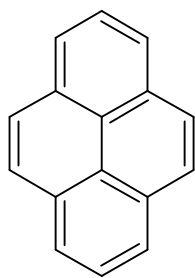
Obr. 10: Emisní spektrum pyrenu – závislost růstu excimeru na koncentraci tenzidu

2.7 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

Pyren je polyaromatický uhlovdík s vysokou symetrií a s unikátní reakcí na polaritu svého okolí. Má v koloidních roztocích prakticky vždy dobře rozlišenou vibrační strukturu emisního spektra. Přechod 0-0 (značen jako „1“) je závislý na polaritě okolí a je lokalizován u vlnové délky 373 nm. Referenčním pásem je přechod 0-2 (značen jako „3“) u vlnové délky 383 nm. Pro stanovení CMC se využívá hodnoty poměru fluorescence u pásů 1 a 3. Tento poměr 1:3 je obrazem polarity okolí pyrenu. Hranice polárního a nepolárního prostředí je brána jako hodnota poměru rovna 1,0 [15]. Pro polární prostředí je hodnota poměru vyšší a pro nepolární zase nižší. Pokud je proces asociace koncentračně závislý, lze závislost poměru 1:3 popsat Boltzmanovou funkcí (viz 3.3.1 Vyhodnocení). Pyren tvoří excimer s emisním maximem při 470 nm. Hodnoty poměru excimeru a monomeru (přechod „1“) v závislosti na koncentraci se využívají při vyhodnocování dat.

Nilská červeň reaguje na zvyšující se polaritu okolí posunem emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. V prostředí pufru se emisní maximum obvykle pohybuje v rozmezí 635 - 650 nm. Závislost emisního maxima na logaritmu koncentrace má podobu S-křivky, ze které je možno pomocí Boltzmanovy funkce určit hodnotu CMC (viz vyhodnocení série s nilskou červí).



Obr. 11: Strukturní vzorec pyrenu a nilské červeně (zleva)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný, nativní	HyA $M_w = 73$ kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 071207-P1 HyA $M_w = 1,46$ MDa, CPN, šarže 141008-E1
acetone	Penta, čistota 99,5 %, šarže 1212021209
CTAB (cetyltrimethylammonium bromid)	Sigma Aldrich, CAS: 57-09-0, Sigma, Ultra $\geq 99,0$ %, šarže 1406508
Mili-Q voda (Milipore Academic)	
NaCl (chlorid sodný)	Lachner s.r.o., CAS: 7647-14-5, čistota 99,5 %, šarže 30453
Nilská červeně	CAS:7385-67-3, <i>BioChemika</i> , for fluorescence $\geq 98,0$ %, šarže 1381468
Pyren	CAS:129-00-0, Fluka, puriss p.a. for fluorescence, šarže 129000

3.2 Postup přípravy vzorků a jejich měření

3.2.1 Příprava vzorků ředěním zásobních roztoků a přímou přípravou koncentrací

Nejprve byla navržena koncentrační řada CTAB ve fosforečném pufru, která pokrývá rozsah koncentrací od $0,001 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (tedy 4 koncentrační řady), tak aby výsledná křivka poměru Py 1:3 měla charakteristický sigmoidní tvar. Navržená koncentrační řada byla proměřena se dvěma fluorescenčními sondami – pyrenem a nilskou červení.

Do první série vialek bylo napipetováno vždy $40 \mu\text{l}$ pyrenu v acetonu a do druhé série vialek vždy $50 \mu\text{l}$ nilské červeně v acetonu.. Konečná koncentrace pyrenu ve 3 ml vzorku tedy byla $2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a konečná koncentrace nilské červeně byla $1,67 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z vialek byl v digestoři odpařen aceton.

Pro přípravu s užitím zásobních roztoků byla koncentrační řada rozdělena na dvě části. Vzorky jednotlivých částí byly připraveny ředěním zásobních roztoků o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Byly použity dva zásobní roztoky, protože při koncentracích v řádech setin a tisícín již nebylo možné odebírat tak malá množství zásobního roztoku o vyšší koncentraci.

Pro přípravu zásobních roztoků bylo odváženo potřebné množství CTAB. Sypká látka byla rozpuštěna ve fosforečném pufru a roztok byl v odměrné baňce doplněn na přesný objem. Dále byly roztoky řádně promíchány. Skladovány byly v zásobních lahvích, ve tmě při laboratorní teplotě.

Pro první část řady (prvních 8 nejvyšších koncentrací) byl použit zásobní roztok CTAB o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro druhou část (dalších 9 nízkých koncentrací) byl použit zásobní roztok CTAB o koncentraci $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Do každé vialky bylo napipetováno potřebné množství příslušných zásobních roztoků CTAB tak, aby po zředění pufrem na celkový objem vzorku 3 ml vznikla potřebná koncentrace vzorku.

Pro přímou přípravu koncentrací byl pro každou koncentraci z řady namíchán vlastní zásobní roztok. Do jednotlivých vialek obou sérií obsahujících fluorescenční sondu bylo napipetováno vždy po 3 ml odpovídajícího zásobního roztoku.

3.2.2 Výběr vhodného složení systému CTAB - hyaluronan

Vliv způsobu přípravy byl zkoumán také u kvartérního systému sonda + prostředí + tensid + hyaluronan. Byly navrženy dva způsoby přípravy ve dvou různých prostředích. První způsob spočívá v namíchání systému v pořadí sonda – prostředí – tensid – hyaluronan. U druhého způsobu bylo postupováno v pořadí sonda – prostředí – hyaluronan – tensid. V obou případech byl jako sonda použit pyren a jako tensid byl zvolen CTAB.

Nejprve byly navrženy kombinace různých výsledných koncentrací CTAB (0,6; 3 a 6 mmol·l⁻¹) s různými výslednými koncentracemi hyaluronanu (1 000, 150, 15 a 1 mg·l⁻¹). Vždy byl použit hyaluronan o dvou molárních hmotnostech – 73 kDa a 1,4 MDa. Jednotlivé kombinace tensidu s hyaluronanem byly připraveny ve dvou různých prostředích; a to ve vodě (Mili-Q) a v roztoku NaCl o koncentraci 0,15 mol·l⁻¹ (viz Příloha 1 - Příloha 4).

První kroky přípravy systému jsou u obou způsobů totožné. Do každé vialky bylo napipetováno vždy 50 µl pyrenu v acetonu. Konečná koncentrace pyrenu v 5 ml vzorku byla 1,5·10⁻⁶ mol·l⁻¹. Z vialek byl v digestoři odpařen aceton. Následně bylo do každé vialky napipetováno takové množství prostředí (buď vody nebo roztoku NaCl), aby po doplnění roztokem CTAB a hyaluronanu byl výsledný objem vzorku 5 ml.

V případě pořadí sonda – prostředí – tensid – hyaluronan bylo dále do vialek napipetováno příslušné množství zásobního roztoku CTAB o koncentraci 20 mmol·l⁻¹ a poté příslušné množství zásobního roztoku hyaluronanu o koncentraci buď 5 g·l⁻¹ nebo 50 mg·l⁻¹. Vždy byl použit zásobní roztok v příslušném prostředí.

V druhém případě bylo pořadí opačné. Nejprve bylo do vialek napipetováno příslušné množství roztoku hyaluronanu o koncentraci buď 5 g·l⁻¹ nebo 50 mg·l⁻¹ a následně příslušné množství zásobního roztoku CTAB o koncentraci 20 mmol·l⁻¹. Opět byly samozřejmě použity zásobní roztoky v příslušném prostředí.

V rámci sady vzorků byla vybrána vhodná kombinace hyaluronanu s CTAB pro další experimenty. Výběr byl proveden podle vlastností a chování systému. Byl tedy hodnocen vzhled a tvorba gelu či sraženiny. Vhodná kombinace hyaluronanu s CTAB byla vybrána tak, aby byl roztok čirý a aby se v něm netvořil žádný gel. Takové vzorky jsou totiž bez komplikací měřitelné pomocí fluorescenční spektroskopie (viz Příloha 1 - Příloha 4).

3.2.3 Práškový hyaluronan + roztok CTAB ve vodě a v roztoku NaCl

Nejprve byly připraveny roztoky CTAB ve vodě a v roztoku NaCl ($c = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) o výsledné koncentraci 0,6 mmol·l⁻¹. Roztoky CTAB byl připraveny zředěním zásobních roztoků o koncentraci 20 mmol·l⁻¹.

Poté bylo naváženo potřebné množství práškového hyaluronanu o dvou různých molárních hmotnostech (73 kDa a 1,46 MDa), tak aby výsledná koncentrace hyaluronanu byla 15 mg·l⁻¹.

Nakonec byla navážky hyaluronanu zality pomocí roztoků CTAB. Směs byla míchána, než bylo dosaženo dokonalého rozpuštění práškového hyaluronanu. Výsledné roztoky byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

Po 24 hodinách byly všechny zásobní roztoky rozpipetovány do vialek. Do každé vialky bylo nejprve napipetováno 50 µl pyrenu v acetonu. Konečná koncentrace pyrenu v 5 ml vzorku byla 1,5·10⁻⁶ mol·l⁻¹. Z vialek byl v digestoři odpařen aceton. Následně bylo do vialek z každého zásobního roztoku napipetováno 5krát 5 ml.

3.2.4 Práškový CTAB+ roztok hyaluronanu ve vodě a v roztoku NaCl

Nejprve byly připraveny roztoky hyaluronanu o dvou různých molárních hmotnostech (73 kDa a 1,46 MDa) ve vodě a v roztoku NaCl ($c = 0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) o výsledné koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztoky hyaluronanu byly připraveny zředěním zásobních roztoků o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Poté bylo naváženo potřebné množství práškového CTAB, tak aby výsledná koncentrace v roztoku byla $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Nakonec byla navážky CTAB zality pomocí roztoků hyaluronanu. Směs byla míchána, než bylo dosaženo dokonalého rozpuštění práškového tenzidu. Výsledné roztoky byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

Po 24 hodinách byly všechny zásobní roztoky rozpipetovány do vialek. Do každé vialky bylo nejprve napipetováno $50 \mu\text{l}$ pyrenu v acetonu. Konečná koncentrace pyrenu v 5 ml vzorku byla $1,5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z vialek byl za sníženého tlaku odpařen aceton. Následně bylo do vialek z každého zásobního roztoku napipetováno 5krát 5 ml.

3.2.5 Směs prášků hyaluronan a CTAB + prostředí (voda nebo NaCl)

Nejprve bylo naváženo potřebné množství práškového CTAB, tak aby výsledná koncentrace v roztoku byla $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně bylo naváženo potřebné množství práškového hyaluronanu o dvou různých molárních hmotnostech (73 kDa a 1,46 MDa), tak aby výsledná koncentrace hyaluronanu byla $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Poté byla směs prášků zalita buď vodou (Mili-Q) nebo roztokem NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Směs byla míchána, dokud nebylo dosaženo dokonalého rozpuštění prášků. Výsledné roztoky byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

Po 24 hodinách byly všechny zásobní roztoky rozpipetovány do vialek. Do každé vialky bylo nejprve napipetováno $50 \mu\text{l}$ pyrenu v acetonu. Konečná koncentrace pyrenu v 5 ml vzorku byla $1,5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z vialek byl v digestoři odpařen aceton. Následně bylo do vialek z každého zásobního roztoku napipetováno 5krát 5 ml.

3.2.6 Metoda měření

3.2.6.1 Fluorimetrie

Ve všech případech byly vialky zavičkovány a ponechány protřepávat do příštího dne. Příští den byly sejmuty z třepačky a bylo provedeno jejich měření na luminiscenčním spektrometru AMINCO-Bowman Series 2. Měření bylo vždy prováděno při $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Stálá teplota byla zajištěna pomocí termostatu.

U vzorků obsahujících pyren byl měřen emisní i excitační sken. Pro emisní sken byl nastaven rozsah vlnových délek od 360 nm do 530 nm. Pro excitační sken byl nastaven rozsah od 310 nm do 340 nm. Na monochromátorech bylo nastaveno emisní maximum na 392 nm a excitační maximum na 336 nm. Citlivost na fotonásobiči byla nastavena automaticky. U každého vzorku byla zaznamenána u emisního skenu hodnota maxima fluorescence prvního a třetího píku a hodnota při 470 nm. (První pík se vyskytoval kolem 372 nm a třetí pík kolem 383 nm.) U excitačního skenu byla zaznamenána hodnota fluorescence při 333 nm a 338 nm.

U vzorků s nilskou červení byl měřen pouze emisní sken. Rozsah vlnových délek byl nastaven od 560 nm do 750 nm. Emisní maximum na monochromátorech bylo nastaveno na 640 nm a excitační maximum na 550 nm. Citlivost na fotonásobiči byla nejprve nastavena automaticky pro nejvyšší koncentraci vzorku (v rozsahu 730 – 810 V). V případě poklesu citlivosti na příliš nízkou hodnotu, byla citlivost ručně nastavena na maximum věrohodného měření 1000 V. Na tuto citlivost byly vzorky doměřeny a následně byly hodnoty přepočítány tak, aby byly všechny při stejné citlivosti. U každého vzorku byla zaznamenána hodnota

vlnové délky polohy maxima a příslušející hodnota fluorescence a také hodnota totálního integrálu pro danou křivku.

3.2.6.2 Tenziometrie

V případě experimentů s přípravou uvedenou v kapitolách 5.1.1 - 5.1.3 bylo provedeno měření povrchového napětí. Měření bylo provedeno na tenziometru KSV Sigma 700. Teplota v laboratoři byla vždy $25,0 \pm 1,0$ °C.

Měření bylo provedeno na základě kroužkové metody. Kroužek je vyroben z platiny a iridia (obvykle 90 % Pt a 10 % Ir). Metoda měření je založena na principu odtrhávání kroužku od hladiny v hodnotě maximální hmotnosti kapaliny, kterou kroužek nese. Síla která musí zvednout kroužek se týká povrchového napětí dle vztahu

$$\gamma = aF, \quad (5)$$

kde a je odvozeno z kapilárního tlaku skrz zakřivený povrch zvednuté kapaliny. Faktor a závisí na geometrických rozměrech kroužku a kontaktním úhlu mezi kroužkem a povrchem kapaliny. Spolehlivé měření lze provést pouze, pokud je kroužek zcela namočený do kapaliny. Přesného stanovení maximální síly je dosaženo opakovaným zvyšováním a snižováním kroužku v oblasti blízké prasknutí lamely kapaliny visící z kroužku. Těsně před prasknutím lamely síla působící na prsten dramaticky klesá. Váha detekuje tuto sílu a okamžitě snižuje polohu kroužku, aby nedošlo k prasknutí lamely [12].

Měření byla provedena se standardním platinovým kroužkem o průměru 9,545 mm v lodičce o celkovém objemu 40 ml s průměrem 46 mm. Rozhraní fází kapalina - plyn bylo nastaveno jako rozmezí voda - vzduch.

Na tenziometru byla nastavena minimální doba jednoho měření 20 minut a počet hodnot povrchového napětí během jednoho měření byl nastaven na 40 hodnot. Hodnoty povrchového napětí byly nakonec zprůměrovány. Platinový kroužek byl mezi každým měřením opálen, opláchnut v kyselině chlorovodíkové a znovu opálen.

3.3 Standardní vyhodnocení dat

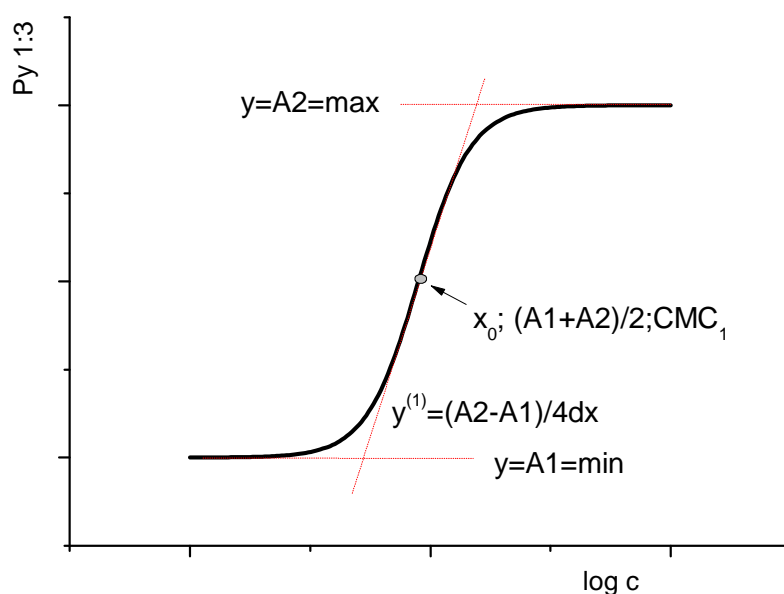
3.3.1 Vyhodnocení dat vzorků obsahujících pyren

Naměřená data závislosti poměru Py 1:3 (Obr. 13, Obr. 14) na logaritmu koncentrace mají sigmoidní charakter. Tyto závislosti lze popsat pomocí Boltzmanovy funkce, resp. pomocí Boltzmanovy křivky se 4 parametry.

$$y(1:3) = \frac{A1(\min) - A2(\max)}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A2(\max) \quad (6)$$

V rovnici (6) odpovídá závisle proměnná y hodnotě poměru Py 1:3, nezávisle proměnná x je celková koncentrace povrchově aktivní látky (v našem případě CTAB), $A1$ a $A2$ jsou horní a dolní meze sigmoidní křivky, x_0 je inflexní bod křivky a dx přímo souvisí s rozmezím nezávisle proměnné, v němž dochází k náhlé změně závislé proměnné y [17]. Obr. 12 ilustruje význam těchto parametrů. Souřadnice na ose x (logaritmus koncentrace), která odpovídá inflexnímu bodu sigmoidní křivky, je hledaná kritická micelární koncentrace.

Data poměru Py 1:3 byly zpracovány v programu OriginPro 8 pomocí funkce Fit Sigmoidal. Výstupem zpracování jsou hodnoty parametrů křivky. Součástí výstupu jsou také standardní odchylky jednotlivých parametrů a intervaly spolehlivosti na 95% hladině pravděpodobnosti. Poněvadž je osa x v logaritmickém měřítku, musíme výstupní hodnotu inflexního bodu x_0 na závěr odlogaritmovat, čímž dostaneme hledanou hodnotu CMC.



Obr. 12: Boltzmanova křivka s vyobrazením parametrů

Zmíněný postup zpracování naměřených dat lze aplikovat i na další získaná data. Například závislost poměru 333:338 nm na logaritmu koncentrace (Obr. 15, Obr. 16) při použití pyrenu jako fluorescenční sondy má také sigmoidní charakter, a proto lze popsat opět Boltzmanovou funkcí. Zpracování této závislosti je tedy obdobné a lze pro něj použít standardního vyhodnocení.

3.3.2 Vyhodnocení dat vzorků obsahujících nilskou červeně

V případě použití nilské červeně jako fluorescenční sondy má závislost polohy vlnové délky maxima emisního spektra VD max na logaritmu koncentrace (Obr. 17, Obr. 18) opět tvar sigmoidní křivky, a proto byla zpracována podle standardního vyhodnocení.

S přihlédnutím k nespolehlivosti individuálního odečtu polohy vlnové délky emisního maxima (hlavně při nízkých koncentracích vzorků, kdy bylo emisní spektrum již značně nekvalitní a odečet byl náročný a nespolehlivý) byla navržena náhradní metoda pro vyhodnocení emisního maxima nilské červeně. V závislosti na polaritě okolí se emisní maximum nilské červeně pohybuje v rozmezí asi 633 – 657 nm. Proto byl navržen poměr vlnových délek 630:660 nm, resp. poměr fluorescence při těchto vlnových délkách. Závislost tohoto poměru na logaritmu koncentrace (Obr. 19 - Obr. 22) lze opět popsat Boltzmanovou funkcí. Vyhodnocení bylo tedy provedeno obdobně jako v předchozích případech.

Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na koncentraci (Obr. 23, Obr. 24) vykazuje nejprve konstantní průběh, který odpovídá vzorkům s koncentrací nižší než je hodnota CMC. Po něm následuje strmý lineární vzrůst odpovídající vzorkům s koncentrací za hodnotou CMC. Vyhodnocení této závislosti spočívá v proložení konstantní a lineární části přímkami a nalezení jejich průsečíku.

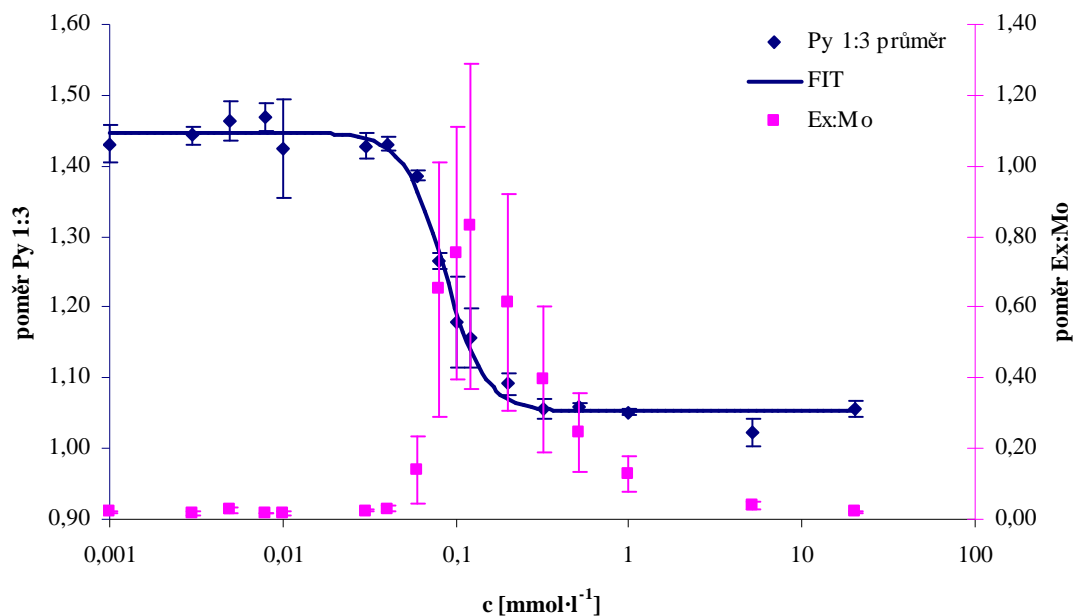
3.3.3 Vyhodnocení povrchového napětí

Jak již bylo řečeno v teorii (viz 2.5.4), povrchové napětí micelárních koloidů klesá velmi rychle s koncentrací a po dosažení CMC se pokles povrchového napětí prakticky zastavuje.

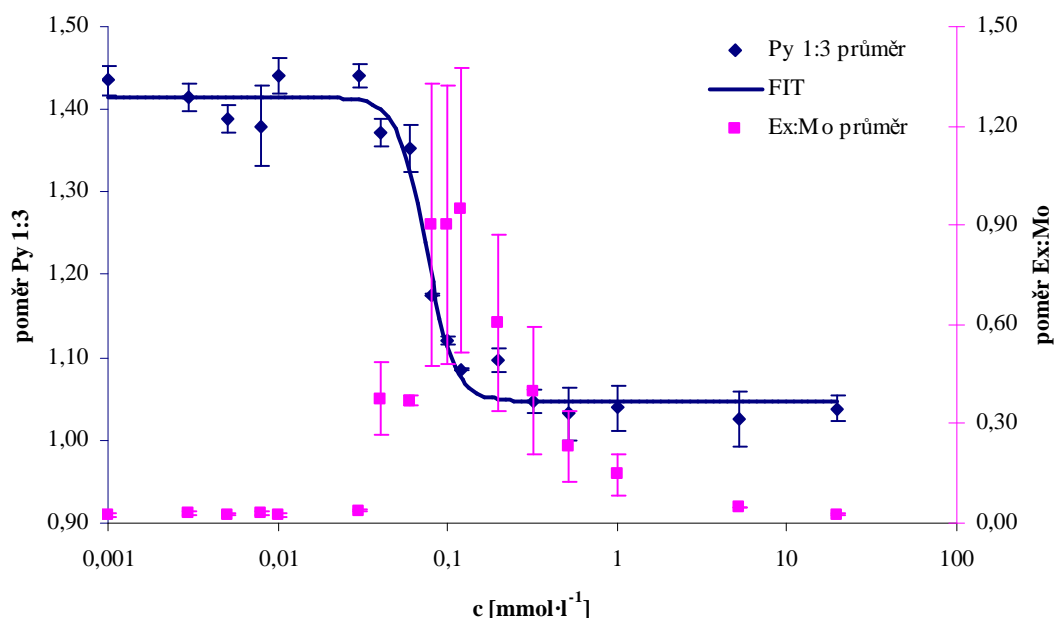
Měřením na tenziometru získáme přímo hodnoty povrchového napětí, které je možno diskutovat.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení CMC CTAB v pufru připraveného ředěním zásobních roztoků nebo přímou přípravou koncentrací



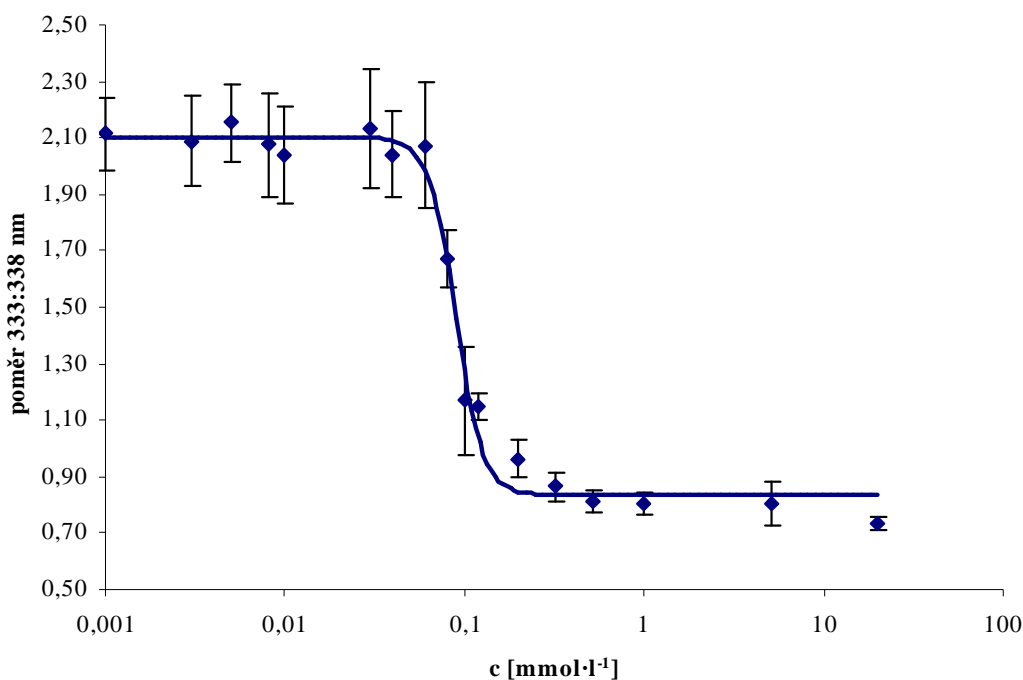
Obr. 13: Závislost poměru Py 1:3 a poměru Ex:Mo na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků



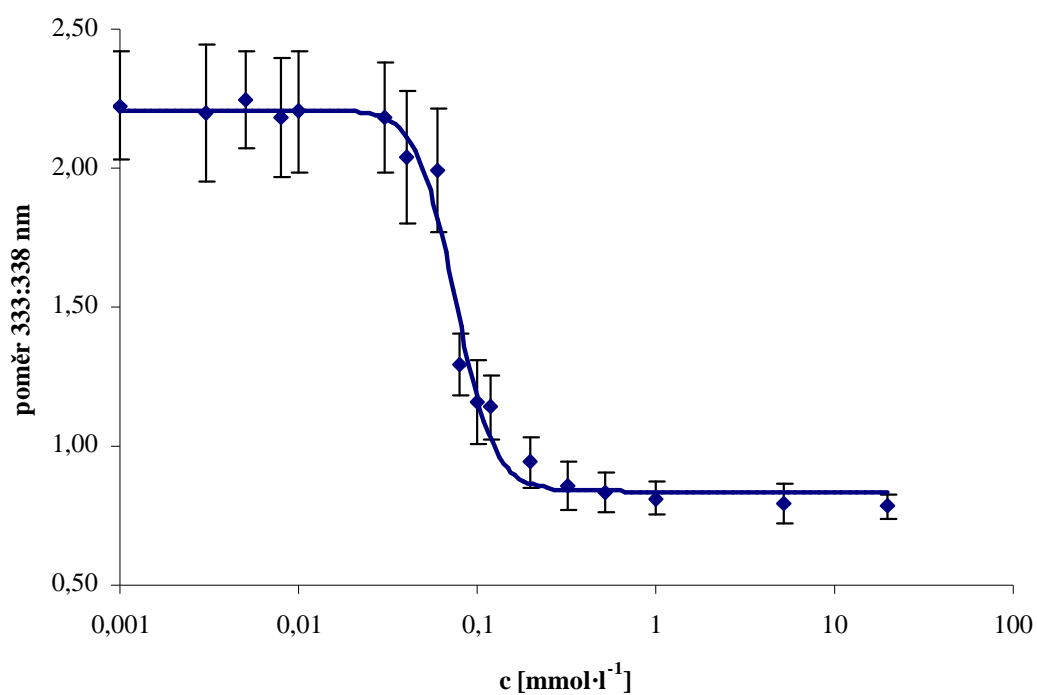
Obr. 14: Závislost poměru Py 1:3 a poměru Ex:Mo na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací

Z grafů (Obr. 13, Obr. 14) je patrné, že závislost $\text{Py } 1:3$ na koncentraci má charakteristický tvar sigmoidní křivky. Signál oblasti nízkých koncentrací před prvním zlomem odpovídá pufru. Oblast lineárního poklesu odpovídá hodnotách koncentrací kolem CMC. Po druhém zlomu následuje konstantní oblast vyšších koncentrací, při kterých je již veškerá sonda solubilizována. Závislost poměru Ex:Mo vykazuje zprvu konstantní průběh. Následuje lineární vzrůst, jehož počátek odpovídá počátku prvního zlomu sigmoidní křivky. Průsečík závislostí odpovídá přibližně inflexnímu bodu křivky, který náleží hodnotě kritické micelární koncentrace (Tabulka č. 1: Souhrn hodnot CMC systému CTAB v pufru).

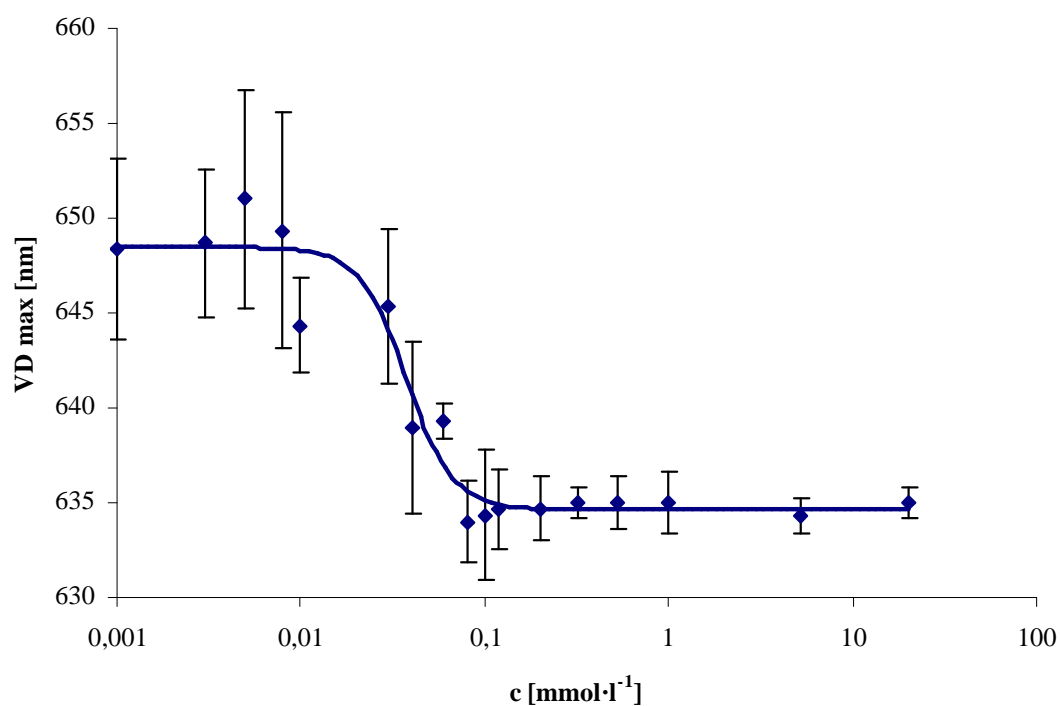
Z grafů závislostí poměru 333:338 nm na koncentraci (Obr. 15, Obr. 16), které byly zaznamenány u excitačního skenu je patrné, že hodnoty jsou přesnější až po dosažení kritické micelární koncentrace. Tuto skutečnost naznačují chybové úsečky, které jsou dány směrodatnými odchylkami jednotlivých dat. Závislosti opět vykazují sigmoidní charakter a hodnota inflexního bodu odpovídá hodnotě kritické micelární koncentrace (viz Tabulka č. 1: Souhrn hodnot CMC systému CTAB v pufru). Oblasti konstantních hodnot odpovídají signálu prostředí (před prvním zlomem) nebo naznačují plnou solubilizaci sondy (po druhém zlomu).



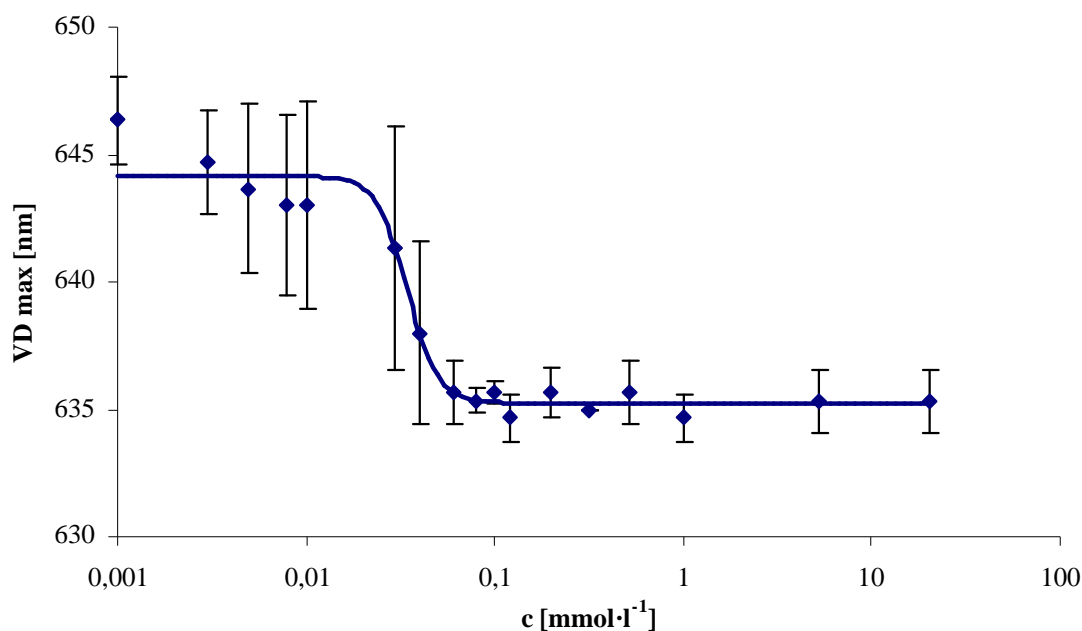
Obr. 15: Závislost poměru 333:338 nm na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků



Obr. 16: Závislost poměru 333:338 nm na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací



Obr. 17: Závislost polohy vlnové délky maxima emisního spektra na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků



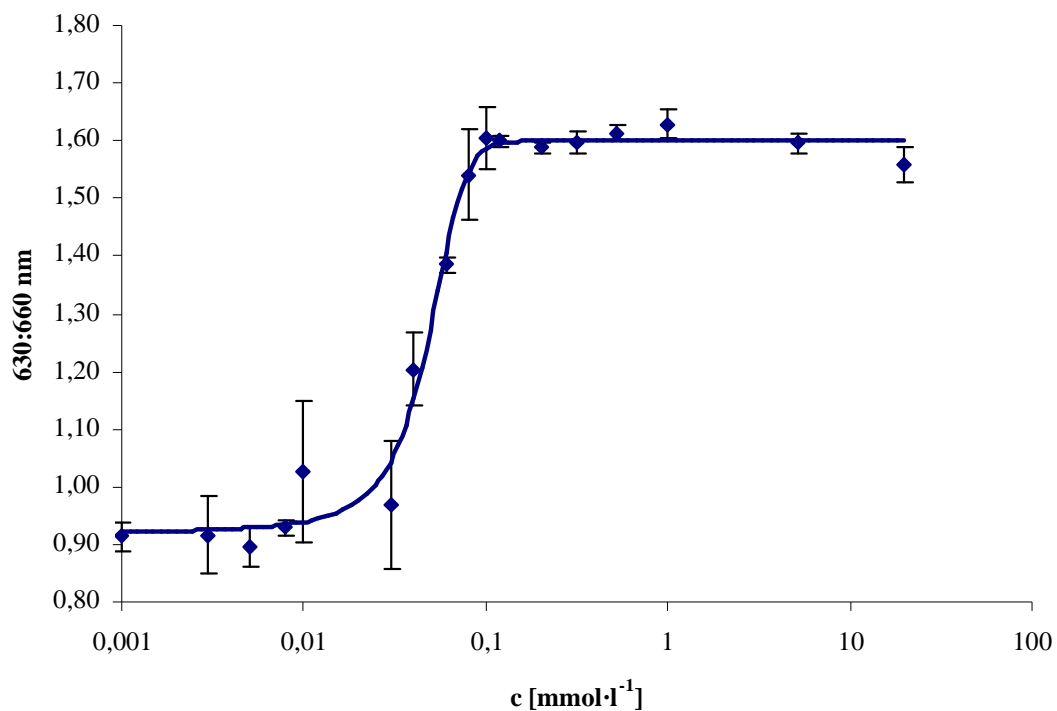
Obr. 18: Závislost polohy vlnové délky maxima emisního spektra na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací

Při použití nilské červeně jako fluorescenční sondy má závislost polohy vlnové délky maxima emisního spektra na koncentraci při přípravě systému ředěním zásobních roztoků (Obr. 17) charakter sigmoidní křivky, ovšem tento charakter není jednoznačný. Hodnoty ve vyšších vlnových délkách mají vysoké hodnoty odchylek, což způsobil hlavně individuální odečet hodnot maxima. Ve vyšších vlnových délkách nebylo maximum tak zřejmé a tudíž docházelo k velkému zkreslení. Toto negativum vykazuje i závislost při přípravě systému přímou přípravou koncentrací zásobních roztoků (Obr. 18). Tato závislost při nízkých koncentracích ani nejeví tvar sigmoidní křivky a tudíž nebylo možné tyto data vyhodnotit. Daty proložená sigmoidní křivka má pouze informativní charakter.

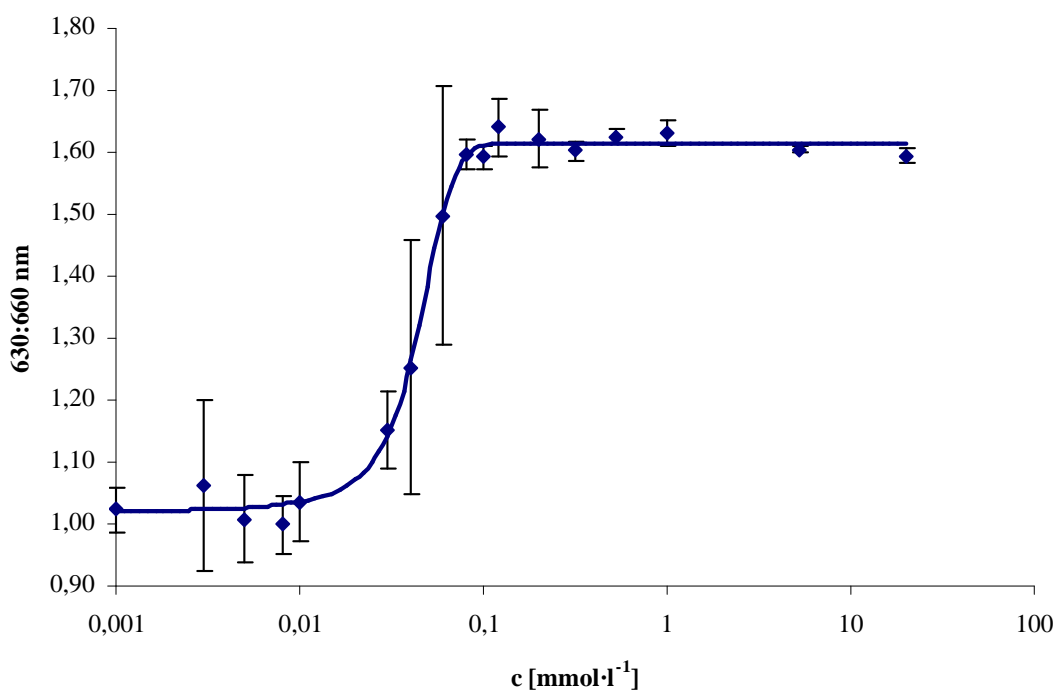
Jak již bylo uvedeno v části standardního vyhodnocení série s nilskou červení (viz kapitola 5.2.2), byl navržen nový způsob vyhodnocení dat emisního skenu při použití nilské červeně jako fluorescenční sondy z důvodu nepřesnosti individuálního odečtu. Z grafů závislostí 630:660 nm (Obr. 19 - Obr. 22) je zřejmý charakteristický sigmoidní tvar. Porovnáním závislostí u obou způsobů přípravy můžeme podotknout, že systémy (resp. hodnoty poměrů) jsou ustálenější při koncentracích vyšších než je CMC.

Grafy s vyobrazením intervalů spolehlivosti (Obr. 21 a Obr. 22) naznačují které hodnoty poměru 630:660 nm můžeme považovat za spolehlivé s 95% pravděpodobností.

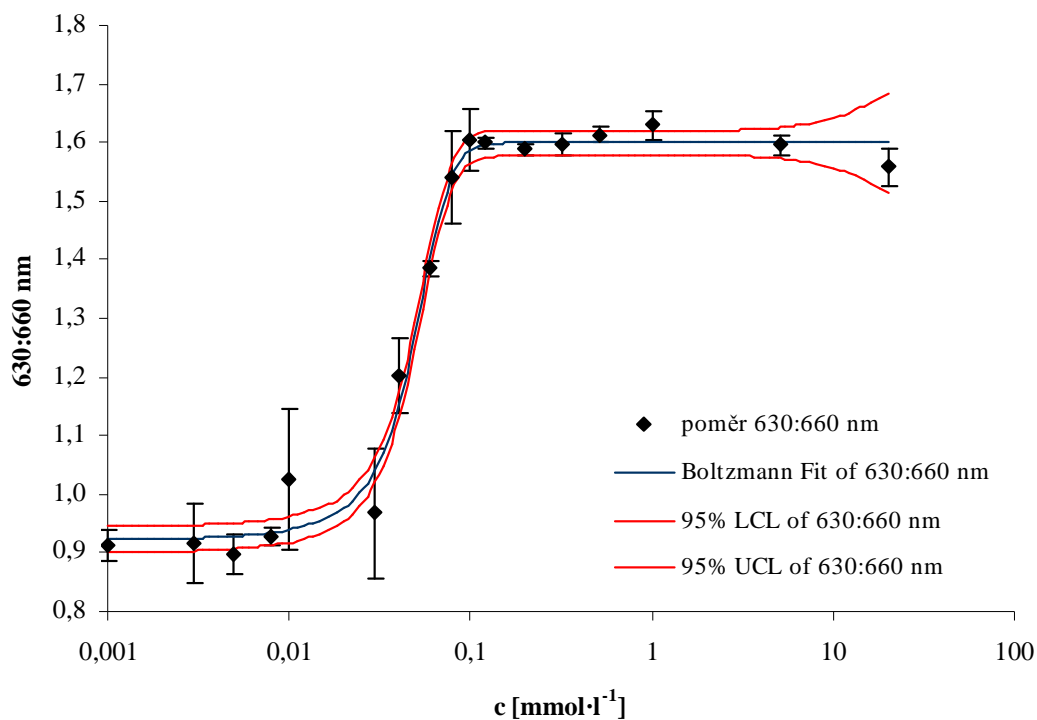
Porovnáním jednotlivých vyhodnocení (závislosti vlnové délky maxima emisního spektra na koncentraci a závislosti poměru 630:660 nm na koncentraci) je zřejmé, že nově navržená a následně zavedená metoda vyhodnocení vykazuje spolehlivější výsledky. Tuto skutečnost potvrzují nejen hodnoty statistických parametrů ale i skutečnost, že pomocí vyhodnocení poměrů 630:660 nm získáváme hodnoty CMC bližší hodnotám získaných vyhodnocením poměrů Py 1:3 nebo poměrů 33:338 nm.



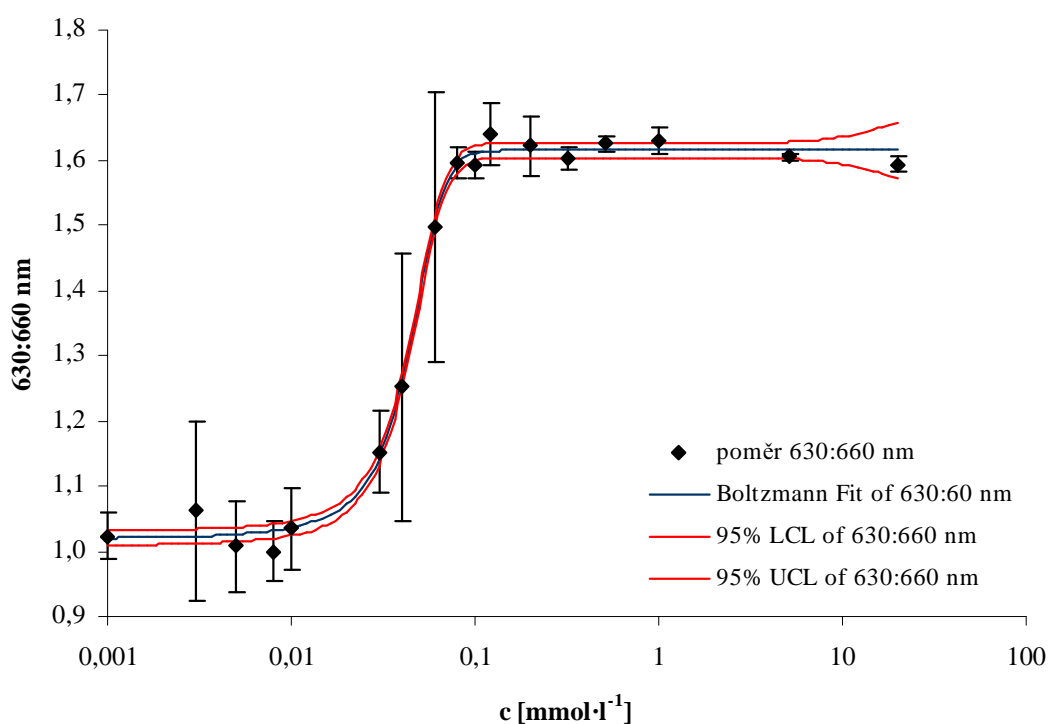
Obr. 19: Závislost poměru 630:660 nm emisních spekter na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků



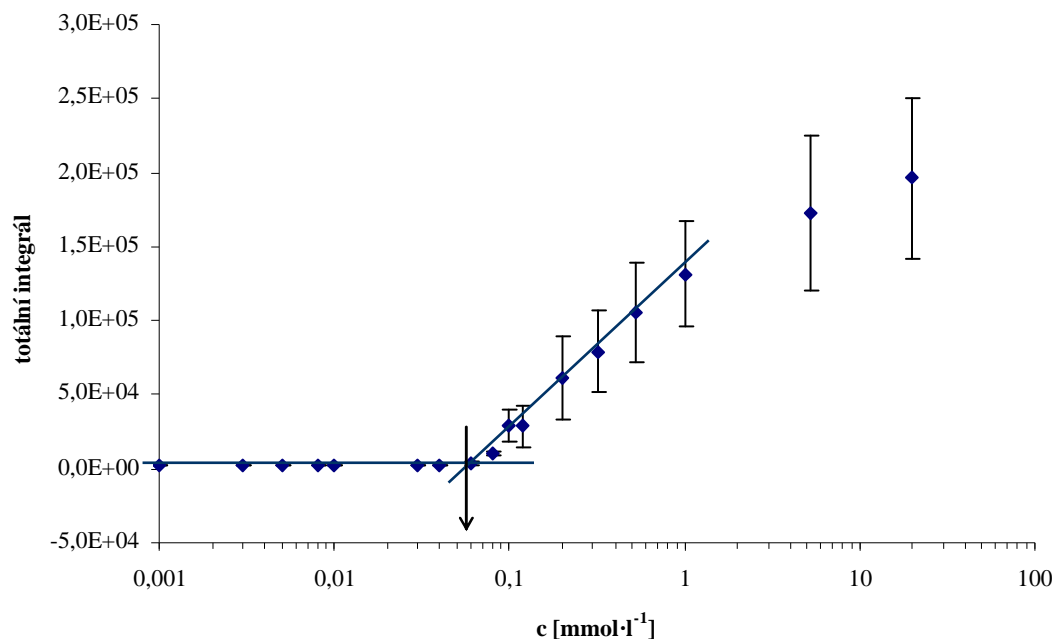
Obr. 20: Závislost poměru 630:660 nm emisních spekter na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací



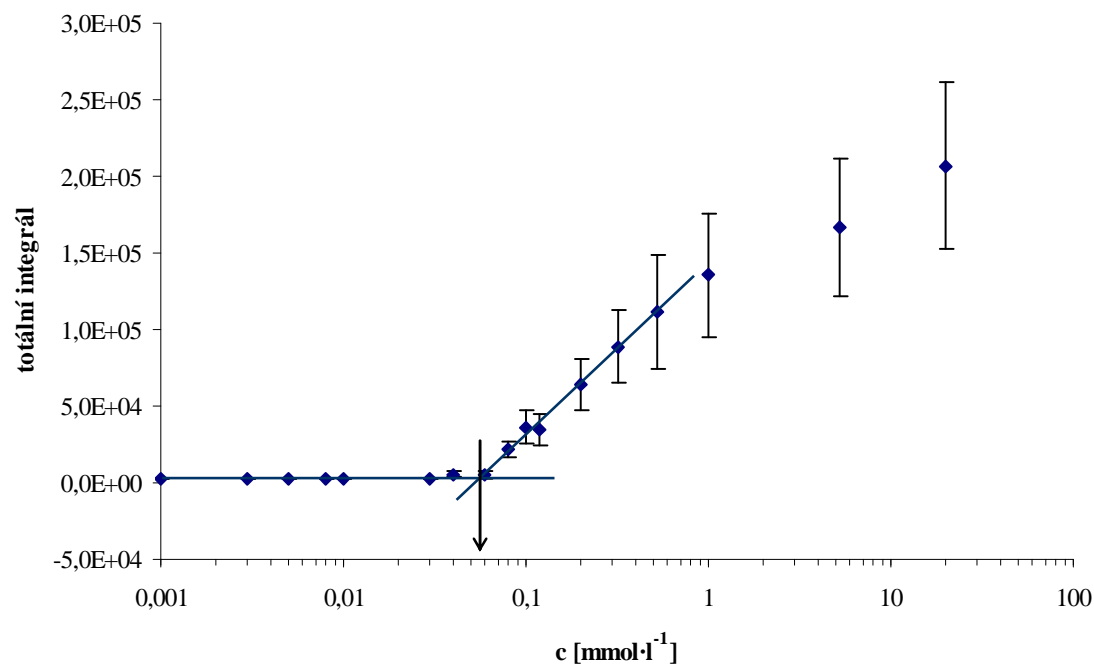
Obr. 21: Závislost poměru 630:660 nm na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků s vyobrazením intervalu spolehlivosti



Obr. 22: Závislost poměru 630:660 nm na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací s vyobrazením intervalu spolehlivosti



Obr. 23: Závislost totálního integrálu emisních spekter na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému ředěním zásobních roztoků

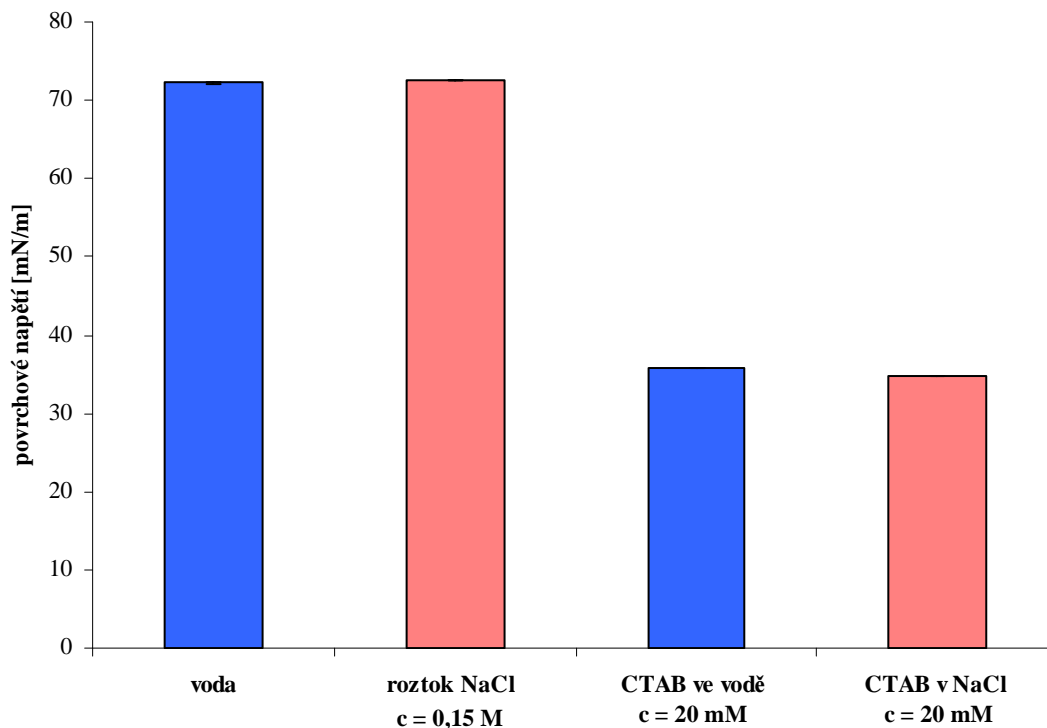


Obr. 24: Závislost totálního integrálu emisních spekter na koncentraci systému CTAB v pufru pro metodu přípravy systému přímou přípravou koncentrací

Závislost totálního integrálu emisního spektra na koncentraci (Obr. 23, Obr. 24) vykazuje nejprve konstantní charakter, který odpovídá hodnotám koncentrací pod CMC. Po dosažení kritické micelární koncentrace nastává lineární růst závislosti, který je ovšem při vysokých koncentracích porušován. Hodnota CMC byla nalezena jako hodnota průsečíku konstantní a

lineární části závislosti (Tabulka č. 1: Souhrn hodnot CMC systému CTAB v pufru). Porovnáním grafů u obou způsobů přípravy není zřejmý žádný markantní rozdíl.

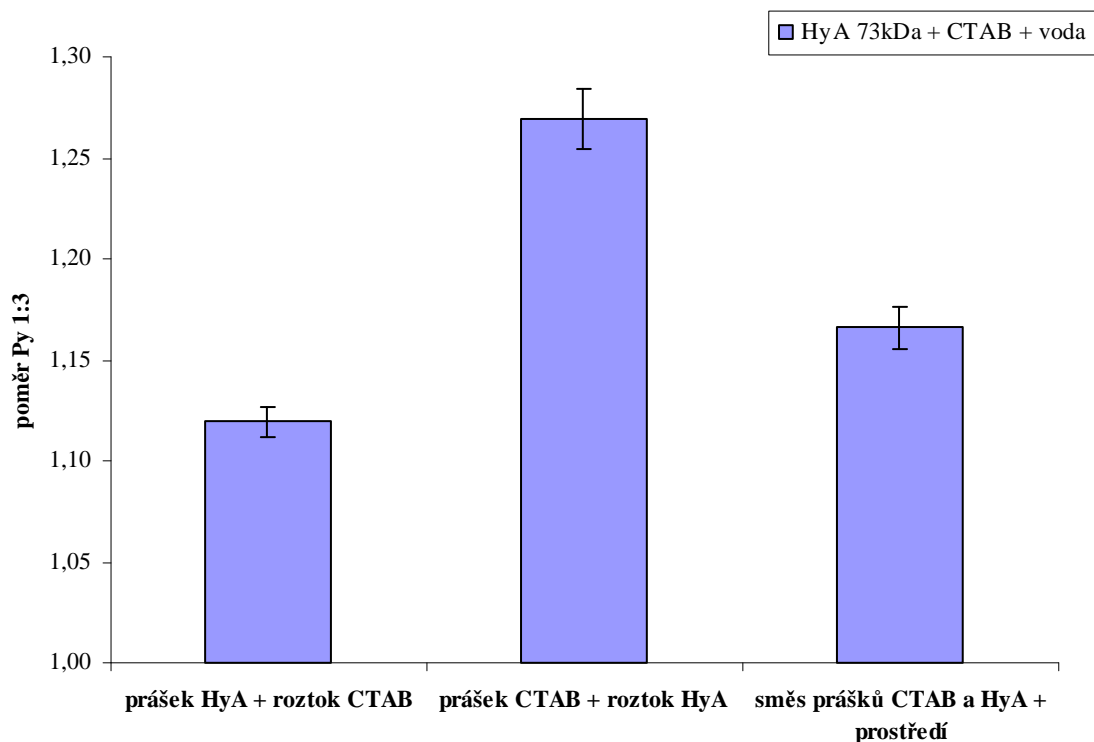
4.2 Experimenty s práškovým CTAB a HyA a jejich roztoky



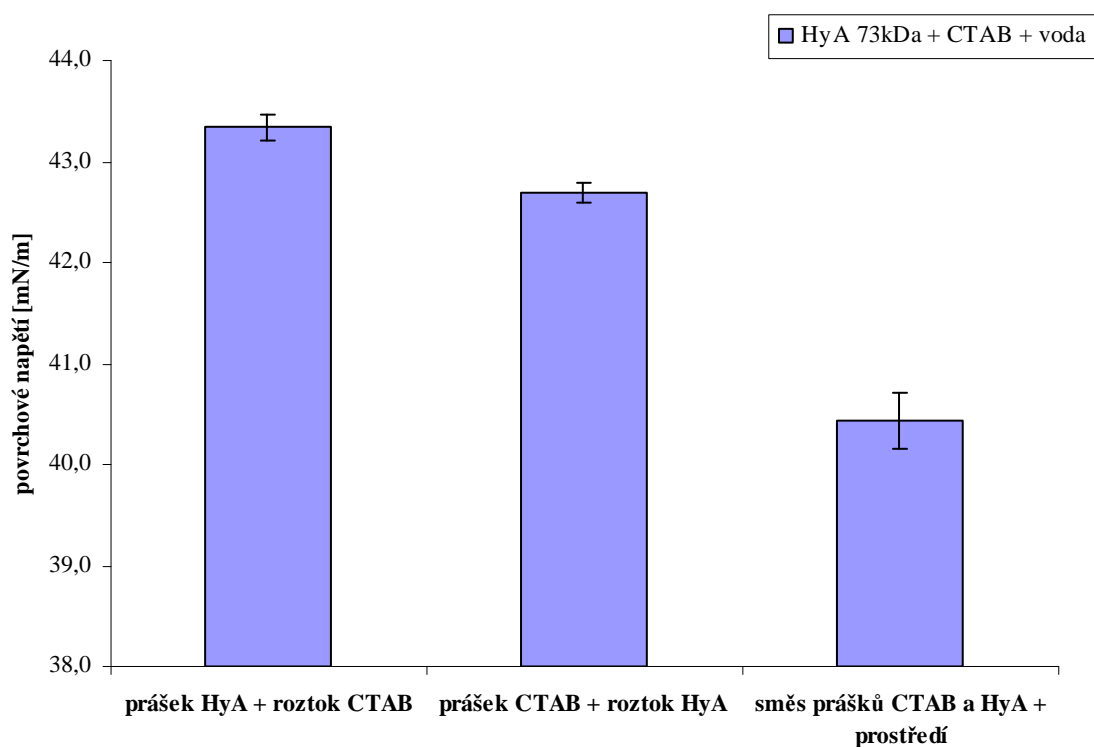
Obr. 25: Ukázka vlivu PAL na povrchové napětí kapalin (pro teplotu 25 ± 1 °C)

Z grafu (Obr. 25) je zřejmý vliv povrchově aktivních látek na povrchové napětí kapalin. Povrchové napětí čisté vody a roztoku NaCl se pohybuje okolo $73 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Přidáním CTAB se povrchové napětí snížilo na hodnoty okolo $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (v obou prostředích).

Jelikož je v dalších experimentech použit CTAB o koncentraci $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jsou hodnoty povrchového napětí mírně vyšší, protože se povrchové napětí s klesající koncentrací PAL zvyšuje.



Obr. 26: Porovnání hodnot poměru Py 1:3 pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 73$ kDa) - CTAB – voda



Obr. 27: Porovnání hodnot povrchového napětí pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 73$ kDa) - CTAB – voda

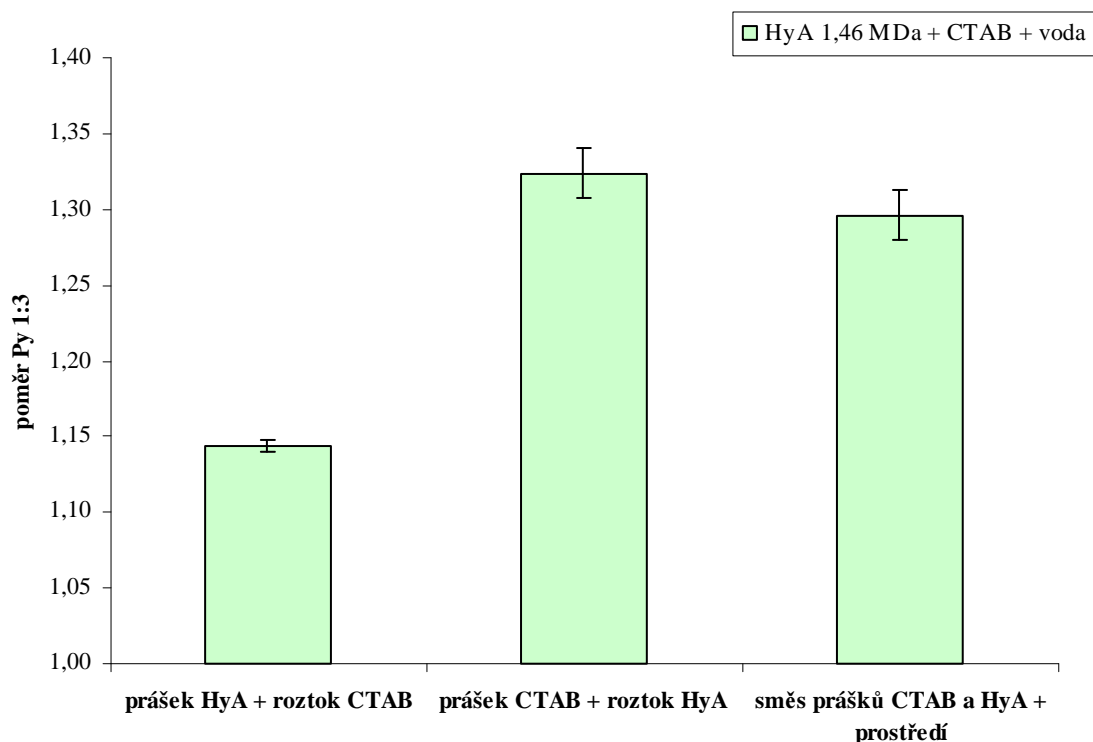
Měření fluorescence systému, ve kterém je obsažen hyaluronan s molekulovou hmotností 73 kDa, CTAB a jako prostředí voda (Obr. 26), ukázalo, že největší poměr Py 1:3 patří

systému, kdy bylo provedeno rozpuštění práškového CTAB roztokem hyaluronanu. Z poměru je zřejmé, že tento systém vykazuje nejvíce polární charakter. Nejméně polární je naopak prostředí systému, kdy bylo provedeno zalití práškového hyaluronanu roztokem CTAB.

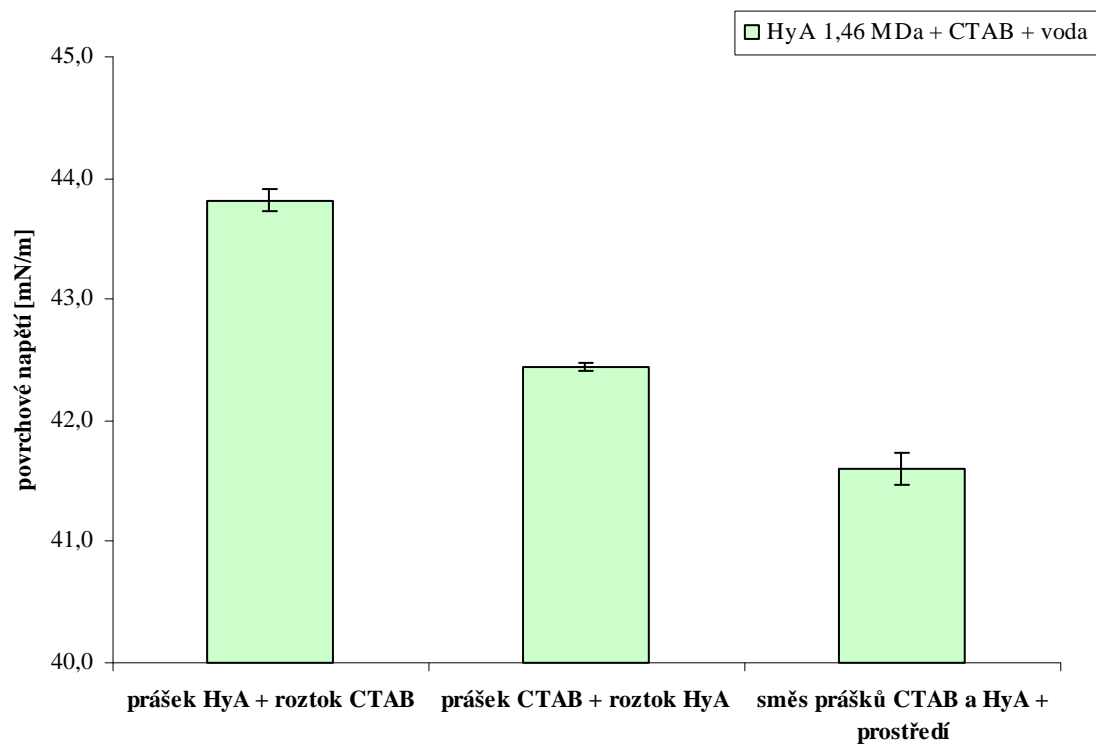
Měření povrchového napětí téhož systému (Obr. 27), které bylo provedeno pro srovnání hodnot, vykazuje nejvyšší povrchové napětí a tudíž i nejvyšší polaritu u systému, ve kterém byl práškový hyaluronan zalit roztokem CTAB. Nejnižší hodnota povrchového napětí patří systému připraveného rozpuštěním směsi prášků prostředím (vodou).

Obě metody měření by se měly navzájem potvrzovat. A to tak, že s hodnotami polaritních poměrů Py 1:3 by měli korespondovat i hodnoty povrchového napětí. Povrchové napětí totiž s rostoucí polaritou systému také roste. Srovnání hodnot obou metod měření ovšem nenaznačuje žádnou souvislost polarity prostředí a povrchového napětí. Srovnávání hodnot nemusí být jednoznačné, protože fluorescenční spektroskopie zkoumá systém z pohledu vnitřku micel uprostřed roztoku, avšak tenziometrie zkoumá pouze povrchové jevy.

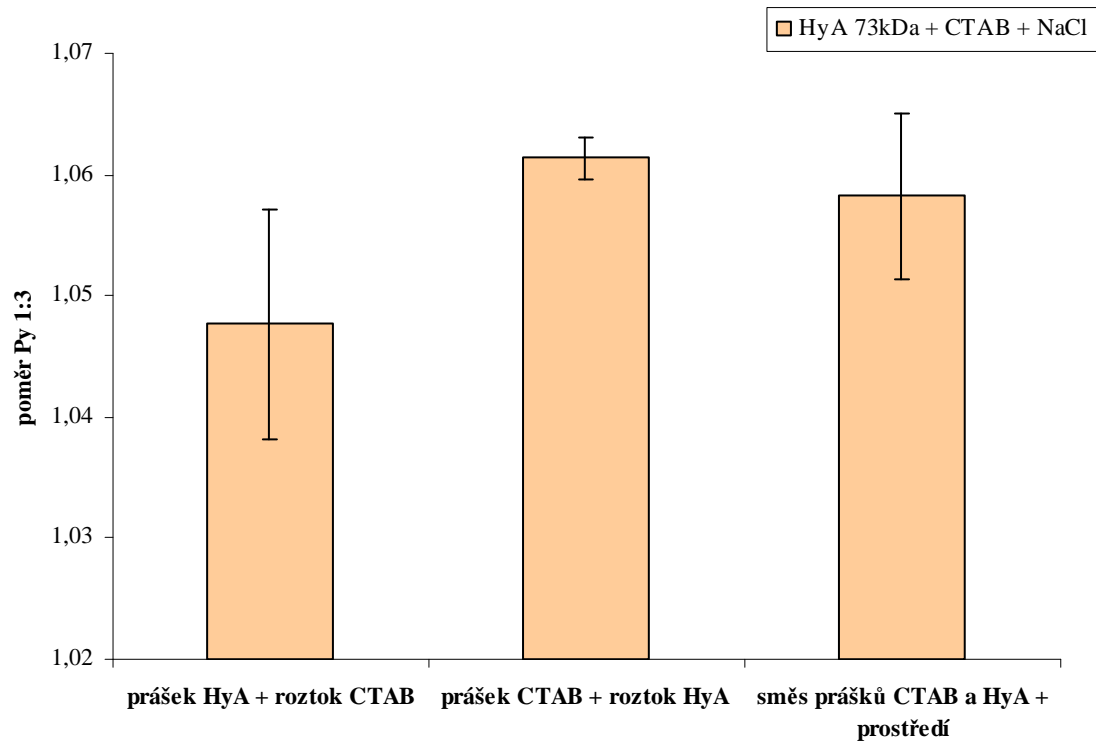
Systém obsahující hyaluronan s molekulovou hmotností 1,46 MDa, CTAB a jako prostředí vodu, byl opět proměřen pomocí fluorescenční spektroskopie a tenziometrie. Měření ukázala obdobnou tendenci v hodnotách polaritního poměru Py 1:3 (Obr. 28) i v hodnotách povrchového napětí (Obr. 29) jako u systému obsahujícím hyaluronan s molekulovou hmotností 73 kDa. Avšak rozdíl mezi polaritou systému připraveného zalitím práškového CTAB roztokem hyaluronanu a systému připraveného zalitím směsi prášků vodou je jen nepatrný v porovnání se systémem obsahujícím hyaluronan s molekulovou hmotností 73 kDa (Obr. 26). Naopak rozdíl v hodnotách povrchového napětí systému připraveného rozpuštěním práškového hyaluronanu roztokem CTAB a systému, ve kterém bylo provedeno zalití práškového CTAB roztokem hyaluronanu je znatelnější v porovnání se systémem obsahujícím hyaluronan s molekulou hmotností 73 kDa (Obr. 27).



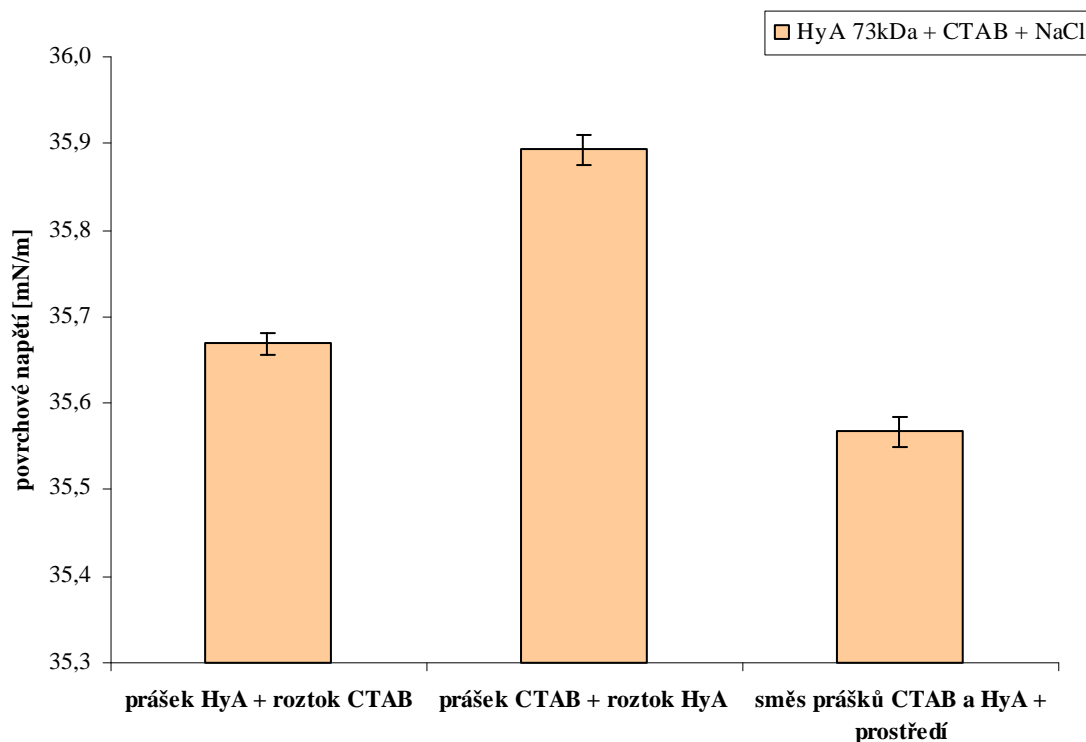
Obr. 28: Porovnání hodnot poměru Py 1:3 pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 1,46$ MDa) - CTAB – voda



Obr. 29: Porovnání hodnot povrchového napětí pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 1,46$ MDa) - CTAB – voda



Obr. 30: Porovnání hodnot poměru Py 1:3 pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 73$ kDa) - CTAB – roztok NaCl



Obr. 31: Porovnání hodnot povrchového napětí pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 73 \text{ kDa}$) - CTAB – roztok NaCl

Bylo provedeno měření fluorescence systému obsahujícím hyaluronan s molekulovou hmotností 73 kDa, CTAB a roztok NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky měření znázorňuje Obr. 30. Jak je z grafu zřejmé, hodnoty poměrů Py 1:3 se liší pouze v řádech stovek a tisíců, což naznačuje fakt, že polarita všech prostředí je velmi blízká. Avšak opět je nejvyšší poměr Py 1:3 systému připraveného rozpuštěním CTAB roztokem hyaluronanu.

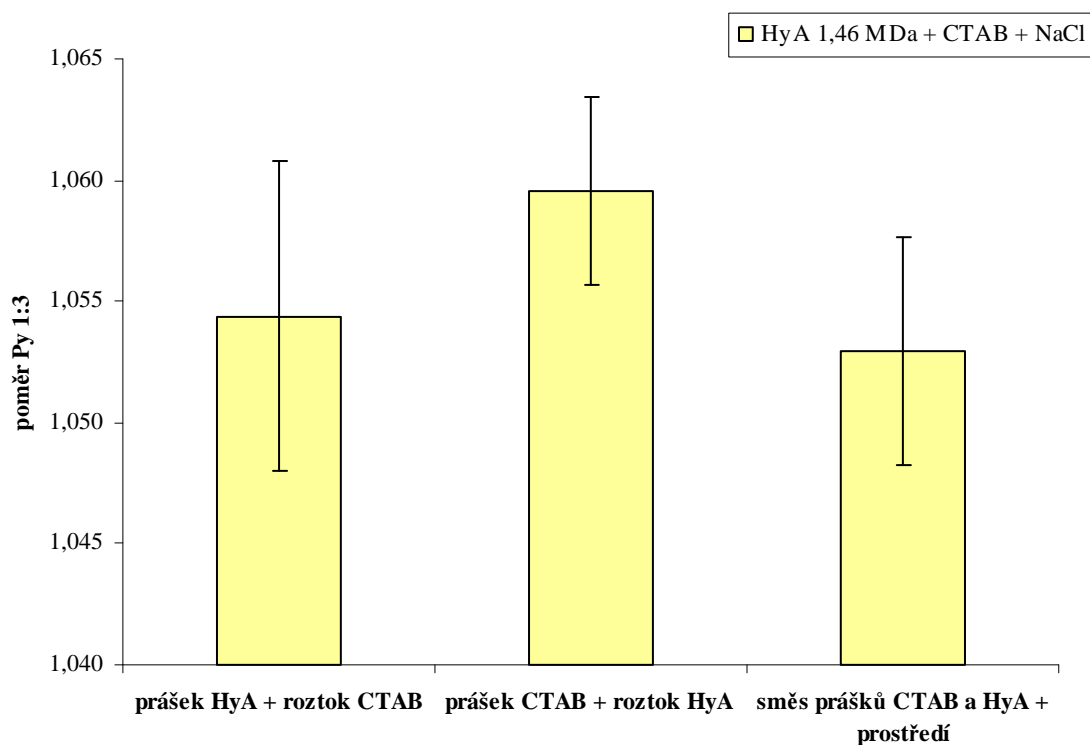
Měřením povrchového napětí téhož systému (Obr. 31) jsme dosáhli potvrzení polarit; nejvyšší hodnotu povrchového napětí má právě systém připravený rozpuštěním práškového CTAB roztokem hyaluronanu.

Nejnižší hodnoty polarit se již nepotvrzují. Hodnota poměru Py 1:3 (Obr. 30) je nejnižší u systému, který byl připraven zalitím práškového hyaluronanu roztokem CTAB, ale hodnota povrchového napětí (Obr. 31) je nejnižší u systému připraveného zalitím směsi prášků roztokem NaCl.

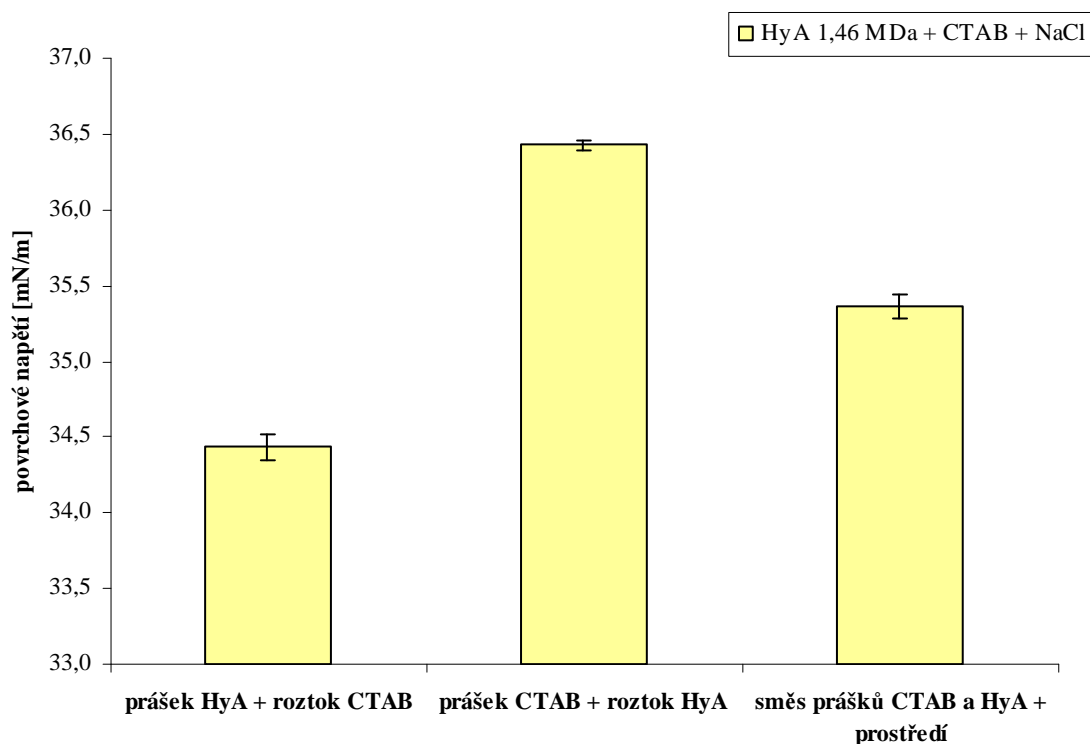
Měření fluorescence systému, který obsahuje hyaluronan s molekulovou hmotností 1,46 MDa, CTAB a roztok NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 32), vykazuje obdobný průběh jako systém obsahující hyaluronan o molekulové hmotnosti 73 kDa, avšak hodnoty polaritních poměrů Py 1:3 se liší pouze v řádech tisíců. Opět systém připravený zalitím práškového CTAB roztokem hyaluronanu vykazuje nejvyšší polaritu prostředí.

Měřením povrchového napětí (Obr. 33) byla opět potvrzena nejvyšší polarita (nejvyšší hodnota povrchového napětí) systému, který byl připraven zalitím práškového CTAB roztokem hyaluronanu.

Porovnáním nejnižších hodnot byla zjištěna opačná tendence ve srovnání se systémem obsahujícím hyaluronan o molekulové hmotnosti 73 kDa (Obr. 30 a Obr. 31). Nejnižší hodnota poměru Py 1:3 byla naopak u systému, který byl připraven rozpuštěním směsi prášků roztokem NaCl a nejnižší hodnota povrchového napětí u systému připraveného rozpuštěním práškového hyaluronanu roztokem CTAB.



Obr. 32: Porovnání hodnot poměru Py 1:3 pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 1,46$ MDa) - CTAB – roztok NaCl



Obr. 33: Porovnání hodnot povrchového napětí pro tři různé experimenty s práškovými látkami pro systém hyaluronan ($M_r = 1,46$ MDa) - CTAB – roztok NaCl

4.3 Shrnutí výsledků

Výsledky jednotlivých vyhodnocení systému CTAB jsou pro porovnání shrnuty v Tabulce č. 1, kde jsou uvedeny hodnoty kritických micelárních koncentrací získaných různými způsoby vyhodnocení a jejich hodnoty spolehlivosti.

Tabulka č. 1: Souhrn hodnot CMC systému CTAB v pufru

hledisko vyhodnocení	příprava ředěním dvou zásobních roztoků		přímá příprava koncentrací	
	hodnota CMC*	R ²	hodnota CMC*	R ²
Py 1:3	0,080 - 0,093	0,9899	0,068 - 0,083	0,9771
333:338 nm	0,084 - 0,096	0,9852	0,069 - 0,084	0,9839
VD max	0,029 - 0,048	0,9296	nelze vyhodnotit	
630:660 nm	0,042 - 0,054	0,9833	0,041 - 0,047	0,9946
totální integrál	0,052	0,9668	0,056	0,9999

*v intervalu spolehlivosti na 95% hladině pravděpodobnosti

V Tabulce č. 2 jsou pro porovnání shrnuty výsledky experimentů s práškovými látkami a jejich roztoky. Tabulka obsahuje polaritní poměry Py 1:3 , hodnoty povrchového napětí a jejich směrodatné odchylky.

Tabulka č. 2: Souhrn výsledků pro experimenty s práškovými látkami a jejich roztoky

pokus	složení systému	poměr Py 1:3	odchylka *	povrchové napětí	odchylka *
práškový HyA + roztok CTAB	HyA (73 kDa) + CTAB ve vodě	1,12	0,008	43,34	0,127
	HyA (1,46 MDa) + CTAB ve vodě	1,14	0,004	43,82	0,092
	HyA (73 kDa) + CTAB v NaCl	1,05	0,009	35,67	0,013
	HyA (1,46 MDa) + CTAB v NaCl	1,05	0,006	34,44	0,086
práškový CTAB + roztok HyA	HyA (73 kDa) + CTAB ve vodě	1,27	0,015	42,69	0,091
	HyA (1,46 MDa) + CTAB ve vodě	1,32	0,017	42,44	0,029
	HyA (73 kDa) + CTAB v NaCl	1,06	0,002	35,89	0,017
	HyA (1,46 MDa) + CTAB v NaCl	1,06	0,004	36,43	0,035
směs prášků HyA + CTAB + prostředí	HyA (73 kDa) + CTAB + voda	1,17	0,010	40,44	0,272
	HyA (1,46 MDa) + CTAB + voda	1,30	0,017	41,59	0,133
	HyA (73 kDa) + CTAB + NaCl	1,06	0,007	35,57	0,018
	HyA (1,46 MDa) + CTAB + NaCl	1,05	0,005	35,36	0,076

* směrodatná odchylka

5 ZÁVĚR

Byla provedena rešerše na téma způsoby přípravy a způsoby následného studia vodných roztoků systémů biopolymer-tenzid. Dále byl proveden návrh a zrealizování experimentů k porovnání různých způsobů přípravy vodných roztoků hyaluronan-tenzid.

Shromážděné literární poznatky ukázaly, že i přes stále se rozvíjející zájem o biopolymer hyaluronan, zatím nebyla publikována žádná práce zabývající se konkrétními kroky přípravy systémů hyaluronan-tenzid, jako je například pořadí míchání jednotlivých složek systému. Rešerše na dané téma byla tedy provedena z obecnějšího hlediska. Byly shromážděny literární poznatky zabývající se studiem koloidních systémů pomocí fluorescenční spektroskopie a vhodností fluorescenčních sond pro toto studium.

Systém biopolymer-tenzid byl zkoumán pomocí fluorescenční spektroskopie s využitím pyrenu a nilské červeně jako fluorescenčních sond. Dále byl tento systém zkoumán také pomocí tenziometrie. Pro bližší zkoumání byl vybrán systém kationaktivní tenzid CTAB-nativní hyaluronan.

Nejprve bylo studováno agregační chování složek systému CTAB ve fosforečném pufru. Byla připravena koncentrační řada tohoto systému ředěním zásobních roztoků a přímou přípravou koncentrací. Agregační vlastnosti byly studovány z hlediska porovnávání kritické micelární koncentrace systémů. Jako fluorescenční sondy byl pro tyto experimenty použity pyren i nilská červeň. Porovnáním výsledků jednotlivých experimentů nebyl zjištěn žádný markantní vliv způsobu přípravy. Lze pouze podotknout, že hodnoty kritické micelární koncentrace získané pro systém připravený přímou přípravou koncentrací jsou nepatrně nižší. Tento rozdíl je patrnější při použití pyrenu jako fluorescenční sondy.

Dále byl studován vliv způsobu přípravy kvartérního systému obsahujícím pyren jako fluorescenční sondu, CTAB, hyaluronan ve dvou různých prostředích (vodě a roztoku NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Tento systém byl připraven v různém pořadí jednotlivých složek a byl hodnocen z hlediska vzhladu a agregačních vlastností vyjádřených polaritním poměrem Py 1:3. Pořadí složek sonda – prostředí – hyaluronan – CTAB nebo sonda – prostředí – CTAB – hyaluronan byla zkoumána v širokém rozmezí kombinací koncentrace CTAB a hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa a 1,46 MDa. Porovnáním jednotlivých výsledků byl pozorován značný vliv v pořadí míchaných látek. Byl také sledován vliv NaCl na systém. Ukázalo se, že prostředí NaCl potlačuje elektrostatické interakce v systému. Z této široké sady vzorků byla vybrána vhodná kombinace CTAB a hyaluronanu pro další experimenty. Při výběru byl zohledněn hlavně vzhlad systému. Systém vhodný pro další experimenty neobsahoval žádnou sraženinu ani gel.

Vybranou vhodnou kombinací se stal CTAB o koncentraci $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a hyaluronan o koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ve dvou molekulových hmotnostech 73 kDa a 1,46 MDa. Tento systém byl vhodný ke studiu pomocí fluorescenční spektroskopie s využitím pyrenu jako fluorescenční sondy. Pro porovnání chování systému bylo provedeno také měření povrchového napětí. Systém byl připraven rozpuštěním práškového hyaluronanu pomocí roztoku CTAB ve vodě nebo v roztoku NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo rozpuštěním práškového CTAB roztokem hyaluronanu v obou prostředích nebo rozpuštěním směsi těchto prášků pomocí zmíněných prostředí.

Jednotlivé způsoby přípravy vykazovaly rozdíly jak v polaritních poměrech, tak v hodnotách povrchového napětí. Lze podotknout, že pro systémy připravené ve vodě se hodnoty získané vyhodnocením fluorescence a povrchového napětí nepotvrzovaly, jak by se dalo předpokládat. Systémy připravené v roztoku soli vykazovaly velice nepatrné rozdíly v polaritních poměrech ve srovnání s polaritními poměry systému připravených ve vodě. Lze tedy konstatovat, že sůl ruší vlivy interakcí na výsledné vlastnosti systému. Hodnoty povrchových napětí systémů se solí více potvrzují tendence polaritních poměrů, avšak ne

zcela, z důvodu minimálních rozdílů polaritních poměrů. V důsledku překrývání směrodatných odchylek nelze přesně určit tendence v růstu nebo poklesu poměrů.

Porovnáním výsledků polaritních poměrů P_y 1:3 lze konstatovat, že nejvíce polární byl systém připravený rozpuštěním práškového CTAB roztokem hyaluronanu. Porovnání hodnot povrchových napětí tuto skutečnost potvrzuje pouze pro systémy připravené v soli. Systémy připravené ve vodě mají nejvyšší povrchové napětí a tedy i polaritu pro systém připravený rozpuštěním práškového hyaluronanu roztokem CTAB.

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny. Práce poskytla základní přehled o vlivu způsobu přípravy systému hyaluronan-CTAB na jeho agregační vlastnosti s ohledem pro použití těchto systémů jako nosičového systému. Zároveň práce poskytla širokou oblast pro další a širší zkoumání vlivu způsobu přípravy daného systému, jelikož byly provedeny pouze základní experimenty pro porovnání jednotlivých způsobů přípravy.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JONES, Marie-Christine; LEROUX, Jean-Christophe. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1999, 48, s. 101 - 111. ISSN 0939-6411.
- [2] KWON, G.S.; OKANO, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996, 21, s. 107 - 116.
- [3] NIZRI, Gilat; MAGDASSI, Shlomo. Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer-surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, 291, s. 169-174. ISSN 0021-9797.
- [4] GLUSHKO, V.; THALER, M. S. R. ; KARP, C. D. Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: Behavior in model solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1981, 210, s. 33 - 42. ISSN 0003-9861.
- [5] RAY, G.B.; CHAKRABORTY, I.; MOULIK, S. P. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, 294, s. 248 - 254. ISSN 0021-9797.
- [6] BALDI, Leonardo D. C. ; IMAZAKI, Eduardo T.; ATVARIS, Teresa D. Z. . Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene. *Dyes and Pigments*. 2008, 76, s. 669-676. ISSN 0143-7208.
- [7] MURATA, Moriyasu; ARAI, Haruhiko. The Interaction Between Polymer and Surfactant: The effect of temperature and added salt on the interaction between polyvinylpyrrolidone and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1973, 44, s. 475 - 480. ISSN 0021-9797.
- [8] GARGALLO, Ligia; DADIĆ, Deodato; MARTÍNEZ-PINA, Francisco. Phase separation behaviour of polymers in water. Temperature and Surfactant effect. *European Polymer Journal*. 1997, 33, s. 1767-1769. ISSN 0014-3057.
- [9] ČOPÍKOVÁ, Jana; Synytsya, Andrii: Polysacharidy, jejich význam a uplatnění. *Chemické Listy*, 2005, č. 99, s. 621
- [10] HASCALL, Vincent C.; LAURENT, Torvard C. . *Glycoforum* [online]. prosinec 1997 [cit. 2010-03-10]. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. Dostupné z WWW: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [11] SCOTT, J. E. . *Glycoforum* [online]. březen 1998 [cit. 2010-03-17]. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. Dostupné z WWW: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>.

- [12] BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2010-04-15]. Dostupné z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/. ISBN 80-7080-579-X.
- [13] BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. *Co je co v povrchové a koloidní chemii : Výkladový slovník* [online]. 1.0. Praha : VŠCHT Praha , 2005 [cit. 2010-04-15]. Dostupné z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/index.html.
- [14] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2008 [cit. 2010-04-15]. Dostupné z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/index.html. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [15] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH : [s.n.], 2001. 387 s. ISBN 3-527-29919-X.
- [16] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. University of Maryland School of Medicine : Springer Science+Business Media, 2006. 954 s. ISBN 0-387-31278-1.
- [17] AGUIAR, J., et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, 258, s. 116 – 122.
- [18] *Invitrogen Tutorials* [online]. 2010 [cit. 2010-03-28]. Molecular Probes. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- [19] FIŠAR, Zdeněk. *1.lékařská fakulta univerzity Karlovy v Praze* [online]. 2003 [cit. 2010-04-17]. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch. Dostupné z WWW: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>.
- [20] *Attension* [online]. 2009 [cit. 2010-04-29]. Surface tension. Dostupné z WWW: <http://www.attension.com/surface-tension.aspx>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Seznam zkratek

zkratka	význam
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimetylammonium bromid
HyA	hyaluronan
NaCl	chlorid sodný
PAL	povrchově aktivní látka

7.2 Seznam symbolů

symbol	význam
a	konstanta odvozená z kapilárního tlaku
c_q	koncentrace zhášela
F	síla působící souběžně s povrchem
I_A	intenzita absorbovaného světla
I_F	intenzita fluorescence
k_i	rychlostní konstanta reprezentující deaktivací procesy
k_q	bimolekulární zhášecí konstanta
k_r	rychlostní konstanta fluorescence
M	základní stav molekuly
M^*	excitovaný stav molekuly
mM	$mmol \cdot l^{-1}$
MM^*	excimer
Q	zhášeč
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
γ	povrchové napětí
λ_{em}	vlnová délka luminiscenční emise
λ_{ex}	vlnová délka excitovaného světla
τ	doba dohasínání fluorescence v přítomnosti zhášedla
τ_0	doba dohasínání fluorescence bez přítomnosti zhášedla
τ_F	doba života fluorescence
Φ	kvantový výtěžek fluorescence v přítomnosti zhášela
Φ_0	kvantový výtěžek fluorescence bez přítomnosti zhášela
Φ_F	kvantový výtěžek fluorescence
UCL	horní mez spolehlivosti na dané hladině pravděpodobnosti
LCL	dolní mez spolehlivosti na dané hladině pravděpodobnosti

8 SEZNAM PŘÍLOH

- | | |
|-----------|--|
| Příloha 1 | Tabulky poměrů emisního a excitačního skenu a vzhledu jednotlivých vzorků pro experimenty s kombinací sonda + prostředí (voda) + CTAB + hyaluronan |
| Příloha 2 | Tabulky poměrů emisního a excitačního skenu a vzhledu jednotlivých vzorků pro experimenty s kombinací sonda + prostředí (voda) + hyaluronan + CTAB |
| Příloha 3 | Tabulky poměrů emisního a excitačního skenu a vzhledu jednotlivých vzorků pro experimenty s kombinací sonda + prostředí (0,15M NaCl) + CTAB + hyaluronan |
| Příloha 4 | Tabulky poměrů emisního a excitačního skenu a vzhledu jednotlivých vzorků pro experimenty s kombinací sonda + prostředí (0,15M NaCl) + hyaluronan + CTAB |

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1

Tabulka č. 3: Kombinace pyren + voda + CTAB + hyaluronan

M (HyA)= 73 kDa								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1a	0,6	1000	čirý, na stěnách u hladiny gelový lem	čirý	nebylo možné detekovat signál,pyren nejspíš v gelu			
2a	0,6	150	čirý, gelový lem	čirý	1000	1,10	0,14	1,03
3a	0,6	15	čirý	čirý	800	1,14	0,32	0,91
4a	0,6	1	čirý	čirý	800	1,38	0,15	1,90
5a	3	1000	čirý, gelový lem, gel na stěnách	čirý	nekvalitní spektrum, pyren nejspíš v gelu			
6a	3	150	lehký zákal	lehký zákal	800	1,07	0,03	0,68
7a	3	15	čirý	čirý	800	1,06	0,03	0,70
8a	3	1	čirý	čirý	800	1,10	0,03	0,69
9a	6	1000	zákal, široký gelový lem	zákal	neměřitelné hodnoty			
10a	6	150	lehký zákal, trochu gelový lem	lehký zákal	800	1,06	0,03	0,69
11a	6	15	čirý	čirý	800	1,05	0,03	0,68
12a	6	1	čirý	čirý	800	1,05	0,02	0,79
M (HyA)= 1,46 Mda								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1b	0,6	1000	čirý, gelový lem, na dně kousky sraženiny	čirý	1000	1,14	0,12	1,04
2b	0,6	150	čirý, gel na stěně, na dně sraženina	čirý	1000	1,14	0,16	1,24
3b	0,6	15	čirý	čirý	800	1,16	0,38	1,02
4b	0,6	1	čirý	čirý	800	1,13	0,27	0,94
5b	3	1000	čirý, gel na stěnách + sraženina	čirý	neměřitelné, pyren nejspíš v gelu (1000 V)			
6b	3	150	lehký zákal, gel na stěnách	lehký zákal	800	1,05	0,03	0,71
7b	3	15	čirý	čirý	800	0,99	0,04	0,69
8b	3	1	čirý	čirý	800	1,06	0,04	0,71
9b	6	1000	lehký zákal, hodně gelu na stěnách + sraženina	lehký zákal	800	1,07	0,04	0,76
10b	6	150	lehký zákal, gel na stěnách	lehký zákal	800	1,07	0,03	0,70
11b	6	15	čirý	čirý	800	0,99	0,03	0,68
12b	6	1	čirý	čirý	620	1,02	0,02	0,69

9.2 Příloha 2

Tabulka č. 4: Kombinace pyren + voda + hyaluronan + CTAB

M (HyA)= 73 kDa								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1a	0,6	1000	čirý, na dně i na stěnách sraženina	čirý	870	1,18	0,05	1,63
2a	0,6	150	čirý, gel na stěnách	čirý	870	1,17	0,05	1,51
3a	0,6	15	čirý	čirý	650	1,13	0,59	1,18
4a	0,6	1	čirý	čirý	650	1,39	0,22	2,35
5a	3	1000	čirý, gel na stěnách	čirý	700	1,09	0,04	0,93
6a	3	150	lehký zákal	lehký zákal	600	1,06	0,05	0,81
7a	3	15	čirý	čirý	600	1,07	0,06	0,85
8a	3	1	čirý	čirý	600	1,07	0,06	0,84
9a	6	1000	silný zákal, gel na stěnách	zákal	neměřitelné			
10a	6	150	čirý	čirý	600	1,06	0,03	0,81
11a	6	15	čirý	čirý	600	1,02	0,03	0,82
12a	6	1	čirý	čirý	600	1,07	0,03	0,82
M (HyA)= 1,46 Mda								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1b	0,6	1000	čirý, na dně i na stěnách kousky sraženiny	čirý,	700	1,12	0,06	1,21
2b	0,6	150	čirý, gel na stěně, na dně sraženina	čirý,	700	1,14	0,06	1,24
3b	0,6	15	čirý	čirý	650	1,14	0,73	1,25
4b	0,6	1	čirý	čirý	650	1,39	0,18	2,29
5b	3	1000	čirý, gelový lem, gel na stěnách + sraženina	čirý	850	1,08	0,04	2,23
6b	3	150	zákal, trochu gel na stěnách	zákal	600	1,07	0,05	0,84
7b	3	15	čirý	čirý	600	1,07	0,06	0,84
8b	3	1	čirý	čirý	600	1,07	0,06	0,84
9b	6	1000	zákal, hodně gelu na stěnách	zákal	600	1,08	0,03	0,79
10b	6	150	lehký zákal, trochu gel na stěnách	lehký zákal	600	1,06	0,03	0,81
11b	6	15	čirý	čirý	600	1,06	0,02	0,81
12b	6	1	čirý	čirý	600	1,07	0,03	0,83

9.3 Příloha 3

Tabulka č. 5: Kombinace pyren + NaCl + CTAB + hyaluronann

M (HyA)= 73 kDa								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1a	0,6	1000	čirý, na stěně slabý gelový film	čirý	690	1,07	0,10	0,89
2a	0,6	150	čirý, na stěně slabý gelový film	čirý	690	1,28	0,08	0,91
3a	0,6	15	čirý	čirý	625	1,04	0,12	0,86
4a	0,6	1	čirý	čirý	625	1,04	0,11	0,86
5a	3	1000	čirý, gel na stěně, gelový lem	čirý	775	1,04	0,03	0,86
6a	3	150	čirý, gel na stěně, gelový lem	čirý	625	1,06	0,03	0,84
7a	3	15	čirý	čirý	625	1,05	0,03	0,84
8a	3	1	čirý	čirý	625	1,02	0,03	0,87
9a	6	1000	zákal, na stěně gel	zákal	695	1,05	0,02	0,82
10a	6	150	lehký zákal, gelový lem	lehký zákal	615	1,05	0,14	0,83
11a	6	15	čirý	čirý	615	1,05	0,02	0,84
12a	6	1	čirý r.	čirý	615	1,04	0,02	0,83
M (HyA)= 1,46 Mda								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1b	0,6	1000	zákal, bez gelu	zákal	615	1,06	0,10	0,86
2b	0,6	150	čirý, na stěně i v roztoku kousky gelu	čirý s gelem	neměřitelné (dochází k rozptýlu na částicích)			
3b	0,6	15	čirý, na stěně kousky gelu (v lemu)	čirý	630	0,92	0,13	0,88
4b	0,6	1	čirý	čirý	630	1,05	0,12	0,88
5b	3	1000	zákal, silný bílý gelový lem	zákal	705	1,07	0,03	0,84
6b	3	150	čirý, bílý gelový lem	čirý	625	1,06	0,03	0,85
7b	3	15	čirý, pár kousků gelu na stěně	čirý	625	1,05	0,03	0,85
8b	3	1	čirý	čirý	625	1,05	0,03	0,85
9b	6	1000	lehký zákal, silný bílý gelový lem	lehký zákal	neměřitelné, pyren nejspíš v gelu (990 V)			
10b	6	150	čirý, bílý gelový lem	čirý	620	1,05	0,02	0,83
11b	6	15	čirý, pár kousků gelu na stěně	čirý	620	1,05	0,02	0,84
12b	6	1	čirý	čirý	620	1,05	0,02	0,84

9.4 Příloha 4

Tabulka č. 6: Kombinace pyren + NaCl + hyaluronan + CTAB

M (HyA)= 73 kDa								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1a	0,6	1000	čirý, slabý gelový lem	čirý	670	1,07	0,10	0,84
2a	0,6	150	čirý, slabý gelový lem	čirý	745	1,06	0,09	0,91
3a	0,6	15	čirý, velmi slabý gelový lem	čirý	630	1,05	0,11	0,84
4a	0,6	1	čirý	čirý	630	1,06	0,11	0,87
5a	3	1000	čirý, gelový lem	čirý	770	1,06	0,03	0,86
6a	3	150	čirý, slabý gelový lem	čirý	630	1,05	0,03	0,83
7a	3	15	čirý	čirý	630	1,06	0,03	0,83
8a	3	1	čirý	čirý	630	1,05	0,03	1,13
9a	6	1000	lehký zákal, silný gelový lem, gel na dně a na hladině	lehký zákal	725	1,05	0,02	0,82
10a	6	150	čirý, gelový lem, na hladině gelová mapa	čirý	620	1,05	0,02	0,82
11a	6	15	čirý, gel na hladině	čirý	620	1,05	0,02	0,82
12a	6	1	čirý	čirý	620	1,06	0,02	0,83
M (HyA)= 1,46 Mda								
vzorek	c CTAB [mmol·l ⁻¹]	c HyA [mg·l ⁻¹]	vzhled vzorku		citlivost [V]	Py 1:3	Ex:Mo	333:338 nm
			ve vialce	v kyvetě				
1b	0,6	1000	zákal, slabý gelový lem, v roztoku rozptýleny částice - gel	zákal s gelem	620	1,04	0,10	0,89
2b	0,6	150	lehký zákal, gelový lem	trochu zákal	750	1,07	0,10	0,95
3b	0,6	15	čirý	čirý	640	1,06	0,11	0,86
4b	0,6	1	čirý	čirý	640	1,05	0,12	0,87
5b	3	1000	silný zákal, slabý gelový lem, kousky gelu v roztoku	silný zákal	neměřitelné, pyren nejspíš v gelu			
6b	3	150	čirý, gel na stěně, trochu gelu na hladině	čirý	640	1,05	0,03	0,84
7b	3	15	čirý, slabý gelový lem	čirý	640	1,05	0,03	0,84
8b	3	1	čirý	čirý	640	1,05	0,03	0,84
9b	6	1000	lehký zákal, gel na stěně, kousky bílého gelu na dně	lehký zákal	neměřitelné, pyren nejspíš v gelu (915 V)			
10b	6	150	čirý, gel na stěně, trochu gelu na hladině i na dně	čirý	625	1,03	0,01	0,84
11b	6	15	čirý, gelový lem	čirý	625	1,05	0,02	0,85
12b	6	1	čirý	čirý	625	1,04	0,02	0,83